

**Biochemische Charakterisierung des
„dual compartment“- Proteins Raver1:
Neue Aspekte der Ligandenbindung und Regulation**

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Anke Zieseniß
aus Neustadt am Rübenberge

1. Referentin: Frau PD Dr. Susanne Illenberger

2. Referent: Herr Prof. Hans H. Arnold.....

eingereicht am: 24.03.05

mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.06.2005

2005

(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinschaftlichen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, Frau PD Dr. Susanne Illenberger, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Zieseniss, A., Fleckenstein, D., van den Heuvel, J., Jockusch, B.M., Illenberger, S. (2004). Initial characterisation of the direct interaction of the dual compartment protein raver1 with actin. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ), Berlin. European Journal of Cell Biology, Supplement 54, Vol. 83, p. 101

Zieseniss, A., van den Heuvel, J., Jockusch, B.M., Illenberger, S. (2004). The dual compartment protein raver1 interacts with actin in a phospholipid dependent fashion. FEBS special meeting on cytoskeletal dynamics: from cell biology to development and disease. 12-16 Januar, 2004, Helsinki, Finland

Zieseniss, A., Ehler, E., Schroeder, U., Schoenenberger C.-A., Jockusch, B.M., Illenberger, S. (2005). The dual compartment protein raver1 interacts with both, nuclear and cytoplasmic actin. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ), Heidelberg.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 „Dual Compartment“-Proteine als Signalmediatoren	2
1.1.1 Cytoskelett assoziierte "dual compartment" Proteine	3
1.1.1.1 β -Catenin	4
1.1.1.2 Aktin	5
1.1.2 Die hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)- Familie	6
1.2 Raver1- ein neues Mitglied der hnRNP-Familie	7
1.2.1 Expression und zelluläre Lokalisation von Raver1	8
1.2.2 Liganden von Raver1	10
1.2.2.1 Das "polypyrimidine tract binding protein" (PTB)	11
1.2.2.2 Vinculin und Metavinculin	12
1.2.2.3 α -Actinin	14
1.2.3 Die zelluläre Bedeutung von Raver1	16
1.3 Ziel der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	20
2.1.3 Oligonukleotide	20
2.1.4 Genbanken	20
2.1.5 Vektoren	20
2.1.6 Antikörper	22
2.1.7 Organismen	23
2.1.7.1 Bakterien	23
2.1.7.2 Hefen	24
2.1.7.3 Tierische Zelllinien	25
2.2 Methoden	25

2.2.1	Molekularbiologische Methoden	25
2.2.1.1	Herstellung Calciumchlorid-kompetenter Bakterien.....	25
2.2.1.2	Transformation kompetenter Zellen.....	26
2.2.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	26
2.2.1.4	Plasmid-Midi- bzw. Maxi-Präparation.....	27
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.2.1.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	27
2.2.1.7	Ligation	28
2.2.1.8	DNA-Sequenzierung	28
2.2.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.1.10	DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen	30
2.2.2	Biochemische Methoden.....	30
2.2.2.1	Proteinbestimmung.....	30
2.2.2.1.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	30
2.2.2.1.2	Densitometrische Proteinbestimmung.....	30
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	31
2.2.2.2.1	Herstellung der Gele.....	31
2.2.2.2.2	Elektrophorese	32
2.2.2.3	„Semidry“ Western-Blot	33
2.2.2.3.1	Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern	33
2.2.2.4	ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“).....	34
2.2.2.5	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	35
2.2.2.5.1	Expressionskinetik.....	35
2.2.2.5.2	Expression von rekombinanten Proteinen mittels Baculovirus-Expression in Insektenzellen	36
2.2.2.5.3	Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli.....	36
2.2.2.5.4	Zellaufschluss und Proteinaufreinigung His-„tag“markierter Proteine über Ni-NTA- Agarose-Beads.....	37
2.2.2.6	Umpuffern von Proteinen.....	39
2.2.2.6.1	Umpuffern von Proteinen mittels Gelfiltration: PD10-Säulen	39
2.2.2.6.2	Umpuffern kleinerer Volumina über Nitrocellulosemembranen.....	39
2.2.2.6.3	Umpuffern von Probenvolumina bis 500 µl – Eppidialyse	39
2.2.2.7	Ankonzentrieren von Proteinen.....	40
2.2.2.8	Gelfiltrationsanalysen.....	40
2.2.2.9	Kosedimentation mit F-Aktin.....	41
2.2.2.9.1	„High speed“-Kosedimentation.....	41
2.2.2.9.2	„Low speed“-Kosedimentation.....	42

2.2.2.10	Bündelungsassays mit TRITC-markiertem Phalloidin.....	42
2.2.2.11	Proteinfällung mittels TCA	42
2.2.2.12	Chemische Vernetzung („chemical crosslink“)	42
2.2.2.13	„Magnetic Bead Pulldown".....	43
2.2.2.14	Ko-Immunpräzipitation.....	43
2.2.2.15	DNaseI-Pulldown	44
2.2.2.16	Protein-Lipid-Overlay-Assay/ „PIP-Strip™"	45
2.2.2.17	„Far Western“-Dot-Overlay	45
2.2.2.18	„Dot Overlay"-Assays.....	45
2.2.2.19	Phosphorylierungsassays.....	45
2.2.2.19.1	PKA-Phosphorylierung	46
2.2.2.19.2	PKC α -Phosphorylierung.....	46
2.2.2.19.3	Quantifizierung des radioaktiven Einbaus.....	46
2.2.2.20	Herstellung von Gewebeextrakten	47
2.2.2.21	Das „Yeast Two-Hybrid" System	47
2.2.3	Zellbiologische Methoden	48
2.2.3.1	Kultivierung von Zellen	48
2.2.3.2	Transfektion von Zellen	48
2.2.3.2.1	Kalziumphosphat-Methode	48
2.2.3.2.2	Transfektion mit FuGene™ Transfektionsreagenz	49
2.2.3.3	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	49
2.2.3.4	Immunfluoreszenz.....	49
2.2.4	Histologische Methoden	50
2.2.4.1	Präparation von Myofibrillen.....	50
2.2.4.2	Färbung von Myofibrillen	51
2.2.4.3	Herstellung von Gefrierschnitten	51
2.2.4.4	Färbung von Gefrierschnitten.....	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Biochemische Untersuchungen zur Wechselwirkung rekombinanter Raver1-Proteine mit verschiedenen Liganden.....	52
3.1.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Raver1-Proteine.....	52
3.1.1.1	Aufreinigung rekombinanter Raver1-Proteine aus Insektenzellen.....	54
3.1.2	Analyse der direkten Interaktion von Raver1 mit bereits beschriebenen Liganden	57
3.1.2.1	Interaktion mit Vinculin und Metavinculin.....	57
3.1.2.2	Interaktion mit α -Actinin	61
3.1.2.3	Interaktion mit PTB.....	64

3.2	Raver1 ist ein Aktin-bindendes Protein	66
3.2.1	Interaktion mit Aktin <i>in vitro</i>	67
3.2.2	Isolierung von Raver1-Aktin-Komplexen aus Zellen	75
3.3	Mögliche Regulationsmechanismen	79
3.3.1	Interaktion mit sauren Phospholipiden	79
3.3.2	Phosphorylierung durch die Proteinkinase C-Alpha und Proteinkinase A	84
3.4	Analyse der subzelluläre Lokalisation und Aktin-Assoziation von Raver1 in Myoblasten und Muskelgewebe	87
3.4.1	Charakterisierung von Raver1-Antikörpern mit C-terminalem Epitop	87
3.4.2	Lokalisation von Raver1 in Skelettmuskel	89
3.4.3	Lokalisation von Raver1 in Herzmuskel und glatter Muskulatur	95
4	Diskussion.....	99
4.1	Die biochemische Charakterisierung von Raver1	99
4.1.1	Nachweis einer direkten Interaktion mit bekannten Liganden	100
4.2	Raver1 ist ein Aktin-bindendes Protein:	101
4.2.1	Die Interaktion von Raver1 mit verschiedenen Aktinkonformationen wird über die C-terminale Region vermittelt	102
4.2.2	Die Assoziation von Raver1 mit Aktin kann sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma erfolgen	104
4.3	Raver1-Translokation zwischen Kern und Cytoplasma.....	105
4.4	Phosphorylierung von Raver1	106
4.5	Neue Aspekte zur zellulären Funktion von Raver1	108
4.6	Ausblick	112
5	Literatur	114
6	Anhang.....	127
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	127
6.2	Tabellenverzeichnis	128
	Danksagung.....	129

Abkürzungen

α -(in Verbindung mit Antikörpern)	anti-
A, mA	Ampere, Milliampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BiPro	Birkenprofilin
bp	(engl.) Basenpaare
BSA	(engl.) Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
C-Terminus	Carboxyterminus
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSP	Dithiobissuccinimidylpropionat
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carbodiimid
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	(engl.) Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-Aktin	globuläres Aktin
HCl	Salzsäure
HMW	„high molecular weight marker“
hnRNP	“heterogeneous nuclear ribonucleo protein”
HRP	(engl.) Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	1000 Dalton
LB	Luria Bertani Broth
LMW	„low molecular weight marker“
MCS	“multiple cloning site”
MQ	Milli Q-Wasser
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MVI	(engl.) Metavinculin-Einschub
MVT	(engl.) Metavinculin-Schwanzdomäne

MW	(engl.) Molekulargewicht
NaP	Natriumphosphat
NES	(engl.) Kernexportsequenz
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NLS	(engl.) Kernlokalisationssequenz
N-Terminus	Aminoterminal
OD _x	Optische Dichte bei x=λ Nanometer
PBS	Phosphate-buffered saline
pc	polyklonal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂ , PtdIns (4,5)-P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PtdIns (3,4,5)-P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	3',5'-cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PNC	perinucleäres Kompartiment
PTB	Polypyrimidine Tract Binding Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	(engl.) Umdrehungen pro Minute
RRM	(engl.) RNA- Erkennungsmotiv
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N – Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VASP	Vasodilator stimulated phosphoprotein
VT	Vinculin-Schwanzdomäne
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactosid
Y2H	„Yeast Two-Hybrid“ System

Zusammenfassung

Raver1 ist ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der hnRNP-Familie. In den meisten bisher untersuchten Zelltypen ist das Protein im Zellkern lokalisiert, in dem es mit dem "polypyrimidine-tract binding protein" (PTB) interagiert. Während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen konnte für Raver1 eine gezielte Translokation an sarkomere Strukturen beobachtet werden. Im ausdifferenzierten Muskel kolokalisiert Raver1 mit den Aktin-bindenden Strukturproteinen Vinculin, Metavinculin und α -Actinin. Bis heute ist die genaue zelluläre Funktion von Raver1 in beiden Kompartimenten nicht bekannt. Erste Hinweise lassen jedoch zumindest im Kern eine Beteiligung an PTB-vermittelten Spleißprozessen vermuten. Im Skelettmuskel scheint Raver1 darüber hinaus auch in Aktin-assoziierte Adhärenzverbindungen eingebunden zu sein. Allerdings ist unklar, ob das Protein eine strukturelle Komponente darstellt oder einen eher regulativen Einfluss hat.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Raver1 Protein näher zu charakterisieren. Hierfür wurde zunächst die Expression und Aufreinigung von rekombinantem Raver1-Gesamtprotein und zwei komplementären Deletionsfragmenten aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen erfolgreich etabliert. In verschiedenen *in vitro* Analysen konnte nun erstmalig die direkte Interaktion mit allen bisher bekannten Liganden eindeutig belegt werden. Darüber hinaus konnte über "Yeast Two-Hybrid"-Analysen Aktin als neuer Bindungspartner von Raver1 identifiziert werden. Die Bindung wird über die C-terminale Region von Raver1 vermittelt, wobei Raver1 in der Lage ist, sowohl mit monomerem G-Aktin als auch F-Aktin zu interagieren. Aktinfilamente werden darüber hinaus durch Raver1 quervernetzt. Wie auch viele andere Aktin-bindende Proteine bindet Raver1 an saure Phospholipide, insbesondere PIP_2 . Die Assoziation von Raver1 mit Aktin wird hierbei durch PIP_2 negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu wird die Bindung an Vinculin und Metavinculin in Anwesenheit von PIP_2 verstärkt. Ein weiterer möglicher Regulationsmechanismus für Raver1 ist die Phosphorylierung, denn das rekombinante Protein wird *in vitro* durch $\text{PKC}\alpha$ und PKA phosphoryliert. Auch in den Insektenzellen scheint ein Teil des Proteins bereits phosphoryliert zu sein. Eine potenzielle Phosphorylierungsstelle konnte im C-Terminus identifiziert werden. Die Isolation nativer Proteinkomplexe aus undifferenzierten C2C12-Zellen, die kernständigen Raver1, PTB und Aktin enthalten, lässt vermuten, dass Raver1 auch *in vivo* mit Kernaktin interagiert. Vergleichende Lokalisationsstudien an Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur implizieren, dass die nucleocytoplasmatische Translokation von Raver1 ein generelles Phänomen bei der Muskeldifferenzierung ist. In gestreifter Muskulatur konnte hierbei die Lokalisation von Raver1 auf die I-Z-I-Region eingegrenzt werden. In diesen Bereichen ist eine direkte Interaktion mit Aktinfilamenten möglich.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse liefern neue Ansatzpunkte für die Aufklärung der zellulären Bedeutung von Raver1. Die Bindung an saure Phospholipide und die posttranslationalen Modifikation durch Phosphorylierung geben erste Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen. Die Assoziation mit Aktin, insbesondere in Kernkomplexen könnte darüber hinaus eine Beteiligung von Raver1 nicht nur an Spleiß-, sondern auch an Translationsprozessen bedeuten, bei denen Kernaktin eine essenzielle Rolle spielt.

1 Einleitung

1.1 „Dual Compartment“-Proteine als Signalmediatoren

Ein wesentliches Charakteristikum eukaryotischer Zellen ist ihre Unterteilung in Kompartimente. Eine solche Kompartimentierung schafft distinkte Stoffwechselreaktionsräume und führt im Wesentlichen zur Trennung von nukleärer DNA-Synthese und –Transkription und cytoplasmatischer Proteinbiosynthese.

Das Muster der Gen- und Proteinexpression ist abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext und die dafür notwendige Expressionskontrolle kann auf vielen Stufen des Informationstransfers von der DNA zur RNA und den Proteinen erfolgen. So können Zellen die Art der synthetisierten Proteine beispielsweise durch Transkriptionsregulation kontrollieren. Daneben spielen jedoch auch vielfältige post-transkriptionelle Regulationsvorgänge, wie die alternative Auswahl von RNA-Spleißstellen, die Kontrolle des RNA-Transports vom Zellkern ins Cytoplasma, die örtliche Beschränkung von mRNAs auf bestimmte Zellregionen oder der regulierte mRNA-Abbau eine wichtige Rolle.

Vorraussetzung für die Anpassung des Expressionsmusters an den zellulären Kontext ist das Vorhandensein intrazellulärer Mediatoren, die Signale aus der Umwelt analysieren und intrazelluläre Prozesse regulieren. Die Umsetzung extrazellulärer Signale zu differentieller Genexpression erfordert dabei den kontinuierlichen Informationsaustausch zwischen Kern und Cytoplasma.

Proteine, welche diese Kommunikation durch signalabhängiges "Wandern" zwischen den Kompartimenten vermitteln, werden als "dual-compartment"- oder pendelnde Proteine bezeichnet. Die Anzahl der identifizierten "dual-compartment"-Proteine steigt kontinuierlich. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt beinhaltet die Liste der zwischen Kern und Cytoplasma pendelnden Proteine Transportrezeptoren und deren Adaptoren (Görlich & Kutay, 1999; Nakielný & Dreyfuss, 1999), Steroidhormon-Rezeptoren (Hache et al., 1999), Transkriptionsfaktoren (Cartwright & Helin, 2000), Regulatoren des Zellzyklus (Pines, 1999) und eine Vielzahl von RNA-bindenden Proteinen (Nakielný & Dreyfuss, 1999; Shyu & Wilkinson, 2000). In den letzten Jahren wurden darüber hinaus vermehrt auch Proteine des Cytoskeletts mit Kern-lokalisierten Prozessen in Verbindung gebracht (Hübner et al., 2001).

Im Folgenden werden zwei Gruppen der "dual compartment"-Proteine vorgestellt, die für die vorliegende Arbeit relevant sind: Cytoskelett-assoziierte Proteine und die sogenannten "heterogeneous nuclear ribonucleoproteins" (hnRNPs) als Vertreter der RNA-bindenden Proteine.

So interagiert beispielsweise Plakoglobin, eine Hauptkomponente von Desmosomen mit dem LEF/TCF Transkriptionsfaktor (Zhurinsky et al., 2000). Symplekin hingegen ist eine Komponente von "Tight Junctions" und ist im Zellkern in der Prozessierung von mRNA involviert (Keon et al., 1996; Takagaki et al., 2000). Für Calretikulin, ein Protein der Fokalkontakte, wird eine weitere Funktion als Kernexportrezeptor (Holaska et al., 2001) und in der Transkriptionsregulation (Dedhar et al., 1994) diskutiert. In den folgenden Kapiteln werden β -Catenin (Kapitel 1.1.1.1), ein Protein Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte und Aktin (Kapitel 1.1.1.2) in ihren dualen Funktionen näher beschrieben.

1.1.1.1 β -Catenin

Während für die meisten der ursprünglich als cytoplasmatisch beschriebenen Cytoskelett-Proteine die funktionelle Relevanz der beobachteten Kernlokalisation bisher noch nicht aufgeklärt ist, konnte früh gezeigt werden, dass β -Catenin nicht nur eine Hauptkomponente von Zell-Zell-Kontakten ist, sondern auch eine Rolle bei der signalvermittelten Genexpression spielt (Gumbiner et al., 1993).

β -Catenin ist ein multifunktionelles Protein, welches mit einer Vielzahl von Bindungspartnern interagiert (Gottardi et al., 2001). In Adhärenzverbindungen bindet β -Catenin an die cytoplasmatische Domäne von E-Cadherin und vermittelt über weitere Adapterproteine die Bindung an Aktinfilamente. Im Zellkern kann es mit LEF/TCF (lymphoid enhancer binding factor (LEF)/T-cell specific factor (TCF)) Transkriptionsfaktoren assoziieren und so Transkriptionsprozesse beeinflussen (Aberle et al., 1997).

Einer der Hauptregulatoren von β -Catenin ist der "Wnt/Wingless growth factor signaling pathway", der die Aktivität der Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK 3β) reguliert. In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird β -Catenin durch GSK 3β phosphoryliert und im Anschluss im Cytoplasma über den Ubiquitin-Proteasom-Pathway degradiert. So wird der freie, cytoplasmatische Anteil von β -Catenin zum einen durch die Rekrutierung in Adhärenzverbindungen, zum anderen durch gezielten Abbau reguliert. In Gegenwart von Wnt ist GSK 3β inaktiv und β -Catenin akkumuliert in unphosphorylierter Form im Cytoplasma, transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Coaktivator der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren (Lustig et al., 2002; Seidensticker et al., 2000). Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die unterschiedlichen Funktionen von β -Catenin als Bestandteil von Adhärenzverbindungen und als Signalprotein von ein und demselben Molekül, oder von distinkten zellulären Pools vermittelt werden.

1.1.1.2 Aktin

Aktin ist ein hoch konserviertes Protein, das die Hauptstrukturkomponente des Mikrofilamentsystems darstellt. Seine cytoplasmatische Funktion als Mediator von Adhäsions- und Bewegungsvorgängen ist gut charakterisiert (Carlier, 1991; Barkalow & Hartwig, 1995; Marchesky & Insall, 1999; Geiger & Bershadsky, 2002; Remedios et al., 2003).

Obwohl Aktin bereits in den 70-er Jahren als Kernkomponente beschrieben wurde (Jockusch et al., 1971, Clark et al., 1977; Clark et al., 1979) blieb die Existenz und Bedeutung des sogenannten "Kern-Aktins" lange umstritten. In den letzten Jahren erhärten sich jedoch die Hinweise, dass Aktin neben seinen gut belegten, cytoplasmatischen Funktionen auch wichtige Aufgaben im Zellkern erfüllt (Pederson & Aebi, 2002; Bettinger et al., 2004).

Erste Hinweise deuten auf eine Beteiligung von Aktin an Transkriptionsprozessen hin: Aktin kann in einem Komplex mit RNA-Polymerase II aufgereinigt werden (Jockusch et al., 1974; Smith et al., 1979) und die Injektion von Aktin-Antikörpern oder von Aktin-bindenden Proteinen in den Kern von Amphibien-Oocyten inhibiert die Transkription Protein-codierender Gene von Lampenbürstenchromosomen (Scheer et al., 1984). Aktin scheint hierbei als kritischer Bestandteil des Transkriptionsinitiationskomplexes in die Transkription durch RNA-Polymerase II involviert zu sein (Egly et al., 1984; Hofmann et al., 2004). Zudem konnte nicht nur die direkte Assoziation von Aktin mit RNA-Polymerase II sondern auch mit RNA-Polymerase I (Philimonenko et al., 2004) und RNA-Polymerase III (Hu et al., 2004) kürzlich nachgewiesen werden. Aktin spielt somit als Cofaktor aller drei RNA-Polymerasen eine unmittelbare Rolle in der Transkription. Außerdem wurde Kern-Aktin in Verknüpfung mit Chromatin-"remodelling"-Komplexen wie BAF (Percipalle et al., 2002) und dem INO80-Komplex (Shen et al., 2003) gefunden und könnte als Bestandteil dieser Komplexe ebenso Einfluss auf die Transkription nehmen.

Neben einer Rolle in der Transkription wird für Kern-Aktin eine Beteiligung an der RNA-Prozessierung und dem RNA-Transport vorgeschlagen. So assoziiert Aktin im Zellkern mit "small nuclear ribonucleoproteins" (snRNPs), welche eine wichtige Rolle bei der RNA-Prozessierung spielen (Sahlas et al., 1993), und mit hnRNP-Proteinen (Percipalle et al., 2001), die u.a. am Transport von mRNA beteiligt sind. Die Injektion von Aktin-Antikörpern in den Zellkern von *Xenopus* Oocyten bewirkt eine effiziente Inhibition des Exports viraler RNAs (Hofmann et al., 2001). Darüber hinaus könnte Aktin ebenso am Transport zellulärer RNA beteiligt sein. Da Aktin mit den nucleoplasmatischen Fibrillen der Kernporenkomplexe assoziiert (Hofmann et al., 2001), ist eine generelle Beteiligung von Kernaktin am Transport zellulärer RNAs wahrscheinlich.

Bisher ist die Konformation und Organisation von Kern-Aktin nicht geklärt (Rando et al., 2000). Kernständiges Aktin kann nicht mit F-Aktin-bindenden Agenzien, wie Phalloidin, dargestellt werden

und auch Gonsior et al. haben gezeigt, dass sich die immunochemische Signatur von Kern-Aktin von cytoplasmatischem Aktin unterscheidet (Gonsior et al., 1999). Es ist daher wahrscheinlich, dass Aktin im nukleären Kontext als Monomer oder in distinkten Oligomeren vorliegt, statt filamentöse Polymere auszubilden. Ein gezieltes Zurückhalten von Aktin-Nukleatoren im Cytoplasma und der gleichzeitige kontinuierliche Export von Aktin aus dem Zellkern, der die Aktinkonzentration unterhalb der für die Eigenpolymerisation kritischen Konzentration hält, könnte die Ausbildung von Aktinfilamenten im Kern verhindern. Der Kernexportrezeptor Exportin 6 (Exp6) scheint hierbei wesentlich am Kernexport von Aktin beteiligt zu sein (Stüven et al., 2003). Exp6 bindet direkt an Aktin, die Interaktion beider Proteine wird jedoch in Gegenwart von Profilin verstärkt. Dieser Befund zeigt beispielhaft, dass auch Aktin-assoziierte Proteine Aufgaben im Zellkern übernehmen. Zu diesen Aktin-bindenden Proteinen mit dualer Lokalisation im Cytoplasma und im Zellkern zählen zudem Thymosin, ein G-Aktin-bindendes Protein, Supervilin, welches seitlich an Aktinfilamente bindet, das "capping"-Protein CapG, Cofilin ein Aktinfilamente destabilisierendes Protein und das Aktinfilament-bündelnde Protein C-Abl (Rando et al., 2000). Zusätzlich können die Hauptregulatoren Aktin-bindender Proteine, Calcium-Ionen und das saure Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) im Zellkern gefunden werden (Miyawaki et al., 1997; Divecha et al., 1995; Cocco et al., 1995; Maraldi et al., 1994). Somit kann die Aktinpolymerisation nicht nur im Cytoplasma sondern auch im Zellkern durch Aktin-bindende Proteine und deren Regulatoren strikt kontrolliert werden.

1.1.2 Die hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)- Familie

Eine weitere große Gruppe der "dual compartment" Proteine sind die hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), eine Gruppe RNA-bindender Proteine, die durch RNA-Erkennungsmotive (RRMs), hnRNPK-Homologie-Domänen (KH Domänen) und RGG (Arg-Gly-Gly)-Boxen gekennzeichnet sind. Neben diesen RNA-Bindungsdomänen enthalten die meisten hnRNP-Proteine sogenannte Hilfsdomänen, welche häufig Glycin- und Arginin-reich sind und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, die Proteinlokalisierung bestimmen oder die RNA-Bindungs-Aktivität modulieren.

HnRNP Proteine sind an einer Vielzahl von nukleären Prozessen, wie beispielsweise der Transkriptionsregulation, der Erhaltung der Telomerlänge, der Rekombination von Immunglobulin – kodierenden Genen, konstitutivem und alternativem Spleißen, der Prozessierung von pre-ribosomaler RNA und dem Prozessieren des 3'-Endes von pre-mRNA, beteiligt (Krecic und Swanson, 1999). Viele hnRNP-Proteine sind ausschließlich kernständig (z.B.: hnRNPC1/C2, hnRNP U), einige können jedoch zwischen Kern und Cytoplasma pendeln (z.B.: hnRNP A1, A2) (Nakienly & Dreyfuss, 1997), wobei sie nicht nur direkt in den nucleo-cytoplasmatischen-Transport von mRNA involviert sind,

sondern auch wichtige Aufgaben bei der mRNA-Lokalisation, Translation und Stabilität erfüllen (Shuy & Wilkinson, 2000).

Ein bekannter Vertreter der hnRNP-Proteine ist PTB ("polypyrimidine tract-binding protein", auch als hnRNPI bezeichnet). Für PTB wurde eine Beteiligung an alternativen Spleißprozessen gezeigt; die Fähigkeit des Proteins zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln, deutet ferner auf eine Beteiligung am Transport von mRNA und deren anschließender subzellulärer Lokalisation im Cytoplasma hin.

Da PTB als kernständiger Ligand des in dieser Arbeit untersuchten Proteins Raver1 identifiziert wurde und die Interaktion mit Raver1 PTB-vermittelte Spleißprozesse modulieren kann, wird in Kapitel 1.2.2.1 näher auf PTB eingegangen.

1.2 Raver1- ein neues Mitglied der hnRNP-Familie

In unserer Arbeitsgruppe wurde mit dem Protein Raver1 ein neues Mitglied der hnRNP-Familie identifiziert (Hüttelmaier et al., 2001). Die Primärsequenz von Raver1 umfasst 748 Aminosäuren (AS), so dass das Protein eine molekulare Masse von etwa 80 kDa aufweist. Der N-terminale Teil des Proteins enthält drei RNA-Erkennungsmotive (RRMs, "RNA recognition motifs"), aufgrund deren Sequenzhomologie zu RRMs der hnRNP-Proteine Raver1 in diese Proteinfamilie einzuordnen ist. Die RRMs von Raver1 sind ca. 90 AS lang, zweigeteilt und besitzen konservierte Motive von 6 bis 8 AS-Resten, die als RNP-1 und RNP-2 bezeichnet werden. Hiermit ähneln die RRMs denen von PTB, eine direkte RNA-Bindung konnte bisher jedoch im Gegensatz zu PTB für Raver1 noch nicht nachgewiesen werden. Weiterhin weist die Primärsequenz laut computergestützter Sequenzanalysen zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) auf sowie leucinreiche Bereiche, die eine Rev- ähnliche Kernexportsequenz darstellen könnten (Abb. 2).

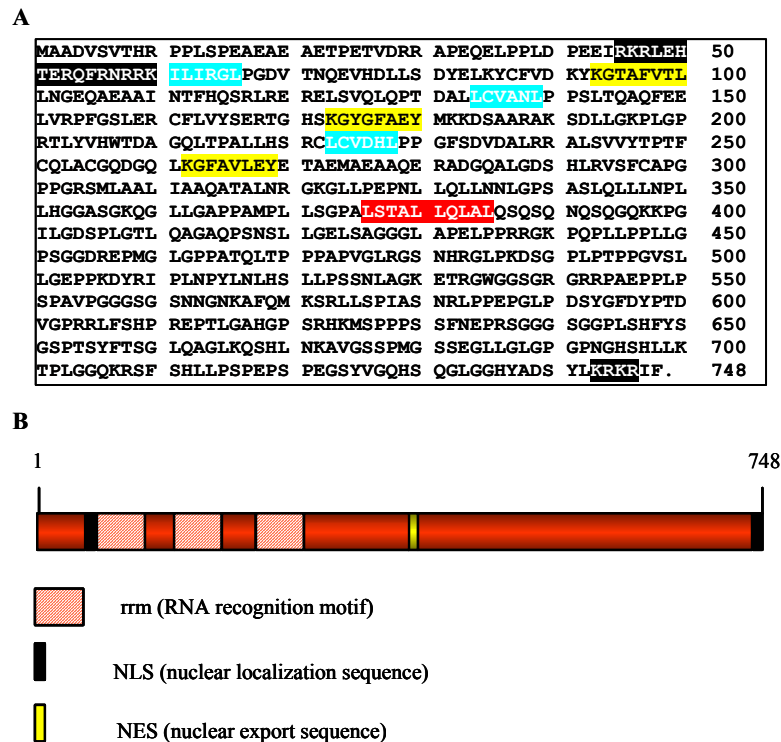


Abbildung 2: Primärstruktur und schematische Darstellung von Raver1

A: Dargestellt sind die wichtigsten Domänen der Raver1-Primärsequenz: die zweigeteilten RRM-s sind gelb (RNP-1-Motiv) und blau (RNP-2-Motiv), die zwei vorhergesagten NLS sind schwarz, die vermutete NES rot markiert (nach Hüttelmaier et al., 2001).

B: Die Polypeptidsequenz ist in rot dargestellt. Drei RNA-Erkennungsmotive (RRM) sind gestreift, eine potentielle Kernexportsequenz (NES) ist in gelb, die Kernlokalisierungssequenzen (NLS) sind in schwarz eingezeichnet.

1.2.1 Expression und zelluläre Lokalisation von Raver1

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass Raver1 ubiquitär exprimiert wird (Hüttelmaier et al., 2001). Allerdings variiert die Expressionsstärke deutlich zwischen den getesteten Geweben und Zelllinien. Eine starke Expression findet sich vor allem in gestreifter Muskulatur und in Organen, welche zu einem Großteil aus epitheliale Gewebe bestehen, wie z. B. Leber und Niere, wohingegen beispielsweise in Gehirn, Lunge und Milz nur geringe Mengen der Raver1-mRNA nachgewiesen werden können. Die Bildung von mRNA beschränkt sich nicht auf spezifische Entwicklungsstadien, sondern ist kontinuierlich vom bereits frühen Embryonalstadium (E7) bis zum adulten Organismus nachweisbar (Hüttelmaier et al., 2001).

In undifferenzierten Zellen ist Raver1 überwiegend im Zellkern lokalisiert wo ein Teil des Proteins in dem sogenannten "perinucleolar compartment" akkumuliert. Raver1 kann prinzipiell jedoch zwischen Kern und Cytoplasma pendeln, wie in Heterokaryon-Analysen gezeigt wurde (Hüttelmaier et al.,

2001). Biochemische Analysen belegen, dass ein geringer Anteil von Raver1 sich auch im Cytoplasma undifferenzierter Zellen befindet (Diplomarbeit K. Falley, 2004) und Immunfluoreszenz- Aufnahmen von SV80-Zellen zeigen eine seinem Liganden Vinculin ähnelnde Lokalisation von Raver1 an den Fokalkontakten (Hüttelmaier et al., 2001). Eine signifikante Translokation von Raver1 aus dem Zellkern ins Cytoplasma scheint differenzierungsabhängig zu sein. So befindet sich Raver1 in undifferenzierten C2C12-Myoblasten im Kern und transloziert während der Differenzierung der Zellen zu Myotuben ins Cytoplasma, wo Raver1 in Adhäsionskomplexen lokalisiert. In der epithelialen Zelllinie MDCK verlässt Raver1 ebenso den Zellkern und lokalisiert an der Zellperipherie in den sogenannten "raver-containing bodies" (RCBs), welche in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden können (D. Fleckenstein, unveröffentlicht). Diese Lokalisationsänderung von Raver1 scheint ebenfalls differenzierungs- oder adhäsionsabhängig zu sein. Möglicherweise spielt hierbei die transkriptionelle Aktivität der Zellen für die Lokalisation von Raver1 eine Rolle.

Bisher sind die Mechanismen und die mögliche Regulation des Kernimports und Exports von Raver1 unbekannt. Erste Hinweise auf mögliche Transportsignale ergaben sich aus der Computeranalyse der Raver1-Primärsequenz oder durch den direkten Vergleich mit bekannten Konsensusmotiven (Abbildung 2). Hierbei wurden zwei mögliche Kernlokalisationssequenzen (NLS) vorgeschlagen: eine N-terminale bipartite basische NLS (Sequenzbereich 45-60, Konsensus-Sequenz RKR...₁₀RRK) und eine am äußersten C-Terminus befindliche kurze Abfolge basischer Aminosäuren, welche alle Merkmale einer klassischen NLS aufweist (Sequenzbereich 743-746, Konsensus-Sequenz KRKR). Die genaue Analyse dieser vermuteten Signalsequenzen konnte bisher lediglich die Funktionalität der Kernlokalisationssequenz im extremen C-Terminus von Raver1 eindeutig belegen. Da die Deletion beider vermuteter Kernlokalisationssequenzen den Kernimport von Raver1 nicht verhindert, ist auch ein "Huckepack"-Mechanismus für den Import denkbar. Eine zentrale, leucinreiche Sequenz (Sequenzbereich 356-385) wurde überdies als mögliches Kernexportsignal vorgeschlagen (Hüttelmaier et al., 2001), konnte bisher allerdings nicht bestätigt werden. Weitere Export-relevante Regionen befinden sich im N-Terminus oder in den Leucin-reichen Bereichen um AS 520 (Diplomarbeit K.Falley, 2004).

Der generelle Transportmechanismus von Raver1 ist nach ersten Untersuchungen im Heterokaryon-Assay CRM1(Exportin1)-unabhängig, denn der Einsatz von Leptomycin B, welches an den Transportrezeptor bindet und ihn so inhibiert, hat keinen Einfluss auf die "Shuttling"-Aktivität von Raver1 (S. Illenberger, unveröffentlicht).

1.2.2 Liganden von Raver1

Erste Hinweise auf eine mögliche zelluläre Funktion eines noch wenig erforschten Proteins geben unter anderem die Interaktionspartner dieses Proteins. Für Raver1 waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit insgesamt vier Liganden mit bekannter zellulärer Funktion beschrieben, die Anhand von "Yeast Two-Hybrid"-Analysen, "Overlay"-Experimenten mit *in vitro* translatiertem Protein und Immunpräzipitationsanalysen als Raver1 Bindungspartner identifiziert worden waren (Hüttelmaier et al., 2001).

Im Kern assoziiert Raver1 mit PTB, einem klassischen Vertreter der hnRNP-Familie. Für PTB konnte bereits eine Beteiligung an der Prozessierung von Prä-mRNA nachgewiesen werden (Wagner & Garcia-Blanco, 2001, siehe auch Kapitel 1.2.2.1). Als cytoplasmatische Liganden konnten die Mikrofilament-assoziierten Strukturproteine Vinculin/Metavinculin und α -Actinin identifiziert werden. Diese Proteine stellen essentielle Komponenten Aktin-assoziiierter Adhärenzverbindungen dar. In der Erstbeschreibung von Raver1 konnten durch die Analyse von Deletionsmutanten die Bindungsregionen für PTB und Vinculin/Metavinculin auf den N-terminalen Bereich von Raver1 eingegrenzt werden, während α -Actinin mit dem C-Terminus von Raver1 interagiert (Hüttelmaier et al., 2001; Abb. 3). Im Folgenden werden diese Liganden mit Schwerpunkt auf deren zelluläre Funktion und Interaktion mit Raver1 näher beschrieben.

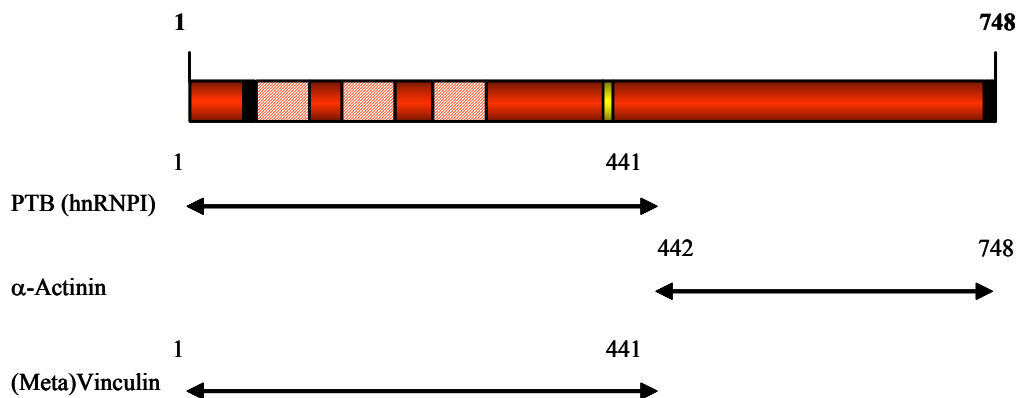


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ligandenbindungsstellen von Raver1 (modifiziert nach Hüttelmaier et al., 2001)

Die Bindungsregionen der bisher identifizierten Liganden sind mit Pfeilen unterhalb des Diagramms dargestellt. Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäure-Primärsequenz. Die farblich hervorgehobenen Boxen gehen aus Abbildung 2 hervor.

1.2.2.1 Das "polypyrimidine tract binding protein" (PTB)

Das "polypyrimidine tract-binding protein" (PTB, auch als hnRNPI bezeichnet) ist bisher der einzige bekannte nukleäre Ligand von Raver1. PTB enthält vier RNA-Erkennungsmotive (RRMs) (Abb. 4), die über die Gesamtsequenz verteilt sind und PTB als hnRNP-Protein ausweisen. Das 57-kDa Protein ist diffus im Nukleoplasma verteilt, wird jedoch konzentriert im sogenannten "perinucleolar compartment" (PNC) gefunden (Ghetti et al., 1992, Matera et al., 1995, Huang et al., 1997). Hierbei handelt es sich um eine Struktur, die an der Peripherie des Nukleolus lokalisiert ist und eine hohe zelltyp- und zellzyklusabhängige Dynamik aufweist und in der, besonders in transformierten Zellen, die Transkription kleiner RNAs und mehrerer hnRNP-Proteine nachgewiesen werden konnte (Huang et al., 1998). Raver1 zeigt ein PTB-ähnliches Verteilungsmuster im Zellkern; beide Proteine kolokalisieren in den PNCs. Die Interaktion beider Proteine wurde bisher mittels "Yeast Two-Hybrid"-Untersuchungen sowie Immunpräzipitations- und Overlay-Experimenten untersucht (Hüttelmaier et al., 2001, Gromak et al., 2003). Diese Versuche deuten darauf hin, dass sich die Bindungsregion für PTB im N-terminalen Bereich von Raver1 befindet.

PTB ist in viele Schritte der Prä-mRNA-Prozessierung involviert, darunter die Regulation der Prä-mRNA Polyadenylierung (Lou et al., 1996) und die "splice-site"-Selektion vieler Gene (Übersicht in Wagner & Garcia-Blanco, 2001) wie unter anderem des α -Tropomyosin-Gens. PTB bewirkt das Spleißen von Nichtmuskel- zu Glattmuskel-Tropomyosin, indem Exon 3 des α -Tropomyosins PTB-abhängig reprimiert wird und dadurch die Glattmuskel-spezifische Tropomyosin-Isoform, die das alternative Exon 2 enthält, begünstigt erzeugt wird. Von Gromak et al. wurde 2003 beschrieben, dass Raver1 in einem *in vitro*-System als Korepressor von PTB wirkt (Gromak et al., 2003): In einer von Glattmuskelzellen abgeleiteten Zelllinie, in der das PTB-abhängige Spleißen mithilfe von "Minigenen" analysiert wurde, verstärkt Raver1 die PTB-abhängige Repression von Exon 3 des α -Tropomyosins.

PTB kann zwischen Zellkern und Cytoplasma pendeln. Als Transportsignale konnten eine am N-Terminus von PTB gelegene basische NLS und eine ebenfalls im N-Terminus gelegene NES identifiziert werden (Perez et al., 1997; Li et al., 2002; Romanelli et al., 2002). Eine zusätzliche im zweiten RNA-Erkennungsmotiv gelegene Sequenz verstärkt den Kernexport (Kamath et al., 2001). Die Phosphorylierung eines in der NES gelegenen Serins durch die 3',5'-cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) wirkt als regulatives Signal und führt zu einer Anreicherung von PTB im Cytoplasma (Xie et al., 2003). Im Cytoplasma ist PTB an der Lokalisation von mRNA in *Xenopus* Oocyten und an der Translation viraler RNAs beteiligt (Cote et al., 1999; Borman et al., 1993; Pilipenko et al., 2001).

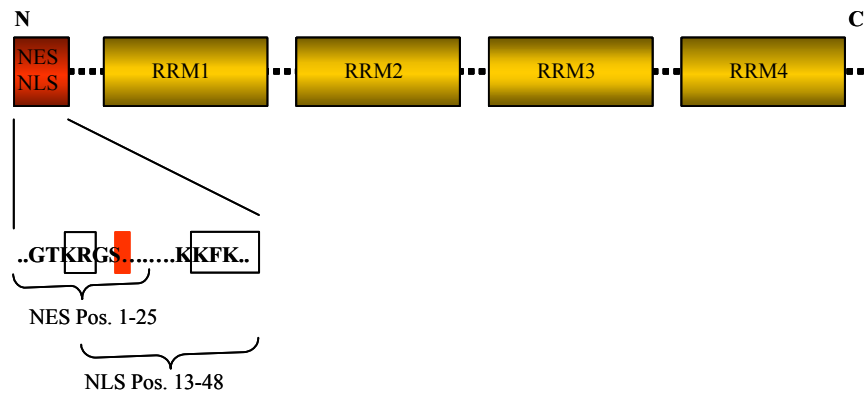


Abbildung 4: Schematische Darstellung von PTB

PTB enthält vier "RNA recognition motifs" (RRMs, gelb) (Ghetti et al., 1992). Am N-Terminus (N) des Proteins befindet sich eine bipartite basische NLS ("nuclear localisation signal"), die beiden basischen Sequenzen sind schwarz umrahmt und werden durch einen Spacer von 30 Aminosäuren getrennt (Perez et al., 1997; Li et al., 2002; Romanelli et al., 2002), welche mit einer untypischen NES ("nuclear export signal", AS 1-25) überlappt (Kamath et al., 2001). Der Export von PTB kann durch die Phosphorylierung von Serin-16 (rot unterlegt) reguliert werden (Xie et al., 2003).

1.2.2.2 Vinculin und Metavinculin

Vinculin ist ein ubiquitär exprimiertes, hoch konserviertes Strukturprotein, das zentraler Bestandteil von Zell-Zell, sowie Zell-Matrix-Verbindungen tierischer Zellen ist. In diesen Strukturen ist Vinculin spezifisch mit cytoplasmatischen Proteinkomplexen assoziiert, die der Verankerung der Mikrofilamente an der Plasmamembran dienen (Geiger et al., 1987).

Vinculin wurde in den membranassoziierten "*dense plaques*" der Glattmuskeln (Geiger et al., 1987), dem peripheren Teil der Z-Scheiben (Costamere) quergestreifter Muskulatur (Pardo et al., 1983a, b; Shear & Bloch 1985), in den Glanzstreifen benachbarter Herzmuskelzellen (Koteliansky & Gneushev, 1983), im Adhäsionsgürtel epithelialer Zellen ("*zonula adherens*") und auch in Blutplättchen und Lymphozyten mit lediglich temporärer Zelladhäsion (Horvath & Muszbek, 1992) nachgewiesen. Vinculin konnte zudem stark angereichert in den "*focal contacts*" kultivierter Zellen lokalisiert werden (Geiger, 1979; Otto, 1990).

Eine essentielle Rolle spielt Vinculin in der Embryogenese. Das Ausschalten des Vinculin-Gens in *Caenorhabditis elegans* führt bereits im L1-Larvenstadium zu einem Verlust der Muskelaktivität und zum Tod der Tiere (Barstead & Waterson, 1991). Homozygote Vinculin $-/-$ Maus-Embryonen ("knock-out"-Mäuse) sind nach dem zehnten Tag der Embryonalentwicklung nicht mehr lebensfähig. Letal wirkt hier wahrscheinlich die gravierende Missbildung der Herzen, welche nicht in der Lage sind zu kontrahieren.

Seit kurzem ist die Kristallstruktur von Vinculin bekannt (Borgon et al., 2004, Bakolitsa et al., 2004), die vorherige, ältere elektronenmikroskopische Analysen im Wesentlichen bestätigt (Winkler et al., 1996). Das gesamte Molekül ist rein α -helical aufgebaut. Bündel dieser α -Helices organisieren sich zu einer etwa 90 kDa umfassenden N-terminalen Kopfdomäne, über die die Rekrutierung in Adhärenzverbindungen erfolgt, und einer C-terminalen Schwanzdomäne (27kDa) (Bendori et al., 1989; Price et al., 1989), welche die Bindung an Aktin vermittelt. Diese Domänen sind über einen kurzen (ca. 40 AS), prolinreichen Bereich miteinander verbunden, der auch als Nacken- oder Gelenkregion bezeichnet wird (Price et al., 1989) (Abb. 5).

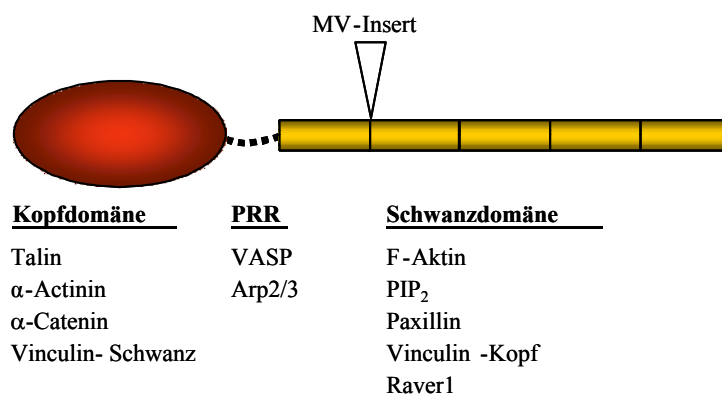


Abbildung 5: Schematische Darstellung des entfalteten Vinculin-Moleküls und einiger Ligandenbindungsstellen

Vinculin besteht aus einer großen, globulären Kopfdomäne, einer flexiblen prolinreichen Halsregion (PRR) und einer Schwanzdomäne. Die Schwanzdomäne besteht aus fünf α -Helices. Zwischen erster und zweiter Helix befindet sich der Metavinculin-spezifische Einschub (MV-Insert), der durch alternatives Spleißen entsteht. Liganden der Kopf- und Schwanzregion sowie der prolinreichen Region sind unter den jeweiligen Regionen aufgeführt.

Für jede dieser Regionen sind verschiedene strukturelle und regulatorische Bindungspartner beschrieben (Abb.5), die Vinculin als Multiligandenprotein ausweisen, das sowohl in Adhäsionsprozesse als auch in die Signalübertragung eingebunden ist. An die Kopfdomäne binden beispielsweise Talin (Belkin & Koteliansky, 1987; Burridge & Mangeat, 1984; Gilmore et al., 1992; Jones et al., 1989; Otto, 1983) α -Catenin (Weiss et al., 1998; Watabe-Uchida et al., 1998) und α -Actinin (Kroemker et al., 1994; Wachsstock et al., 1984). VASP (Brindle et al., 1996, Reinhard et al., 1996) und der Arp2/3-Komplex (DeMali et al., 2002) interagieren mit der prolinreichen Region. F-Aktin (Gilmore & Burridge 1996; Menkel et al., 1994), Paxillin (Turner et al., 1990; Wood et al., 1994) sowie saure Phospholipide (Burn & Burger 1987; Ito et al., 1983; Niggli et al., 1986) sind als Bindungspartner der Schwanzdomäne beschrieben.

Die Ligandenwechselwirkung wird durch eine intramolekulare Kopf-Schwanz-Interaktion reguliert, durch die die Bindungsstellen der meisten Liganden maskiert werden. *In vitro* kann das Vinculinmolekül entweder durch Zugabe saurer Phospholipide, die an die Schwanzdomäne binden (Ito et al., 1983; Fukami et al., 1994; Gilmore & Burridge, 1996; Johnson & Craig, 1995; Weekes et al., 1996) oder durch die Bindung geeigneter Talinpeptide an den Vinculinkopf (Bass et al., 2002; Izard et al., 2004) geöffnet werden. Die Strukturuntersuchungen lassen vermuten, dass die Ligandenbindungsstellen in Kopf- und Schwanzdomäne wechselseitig durch Konformationsänderungen reguliert werden, so dass die vollständige Aktivierung von Vinculin wahrscheinlich die simultane Bindung mehrerer Liganden erfordert. Die Bindung saurer Phospholipide ist *in vivo* jedoch nicht für die initiale Rekrutierung von Vinculin in Adhäsionskomplexe essentiell. Vielmehr scheint Vinculin eine Art Sensor lokaler PIP₂-Spiegel im Bereich von Adhärenzverbindungen zu sein und trägt somit wesentlich zur Dynamik dieser Strukturen bei (Chandrasekar et al., 2005).

In Muskelgewebe existiert mit Metavinculin eine zweite Isoform, die durch alternatives Spleißen von Exon 19 entsteht und deren genaue Funktion bisher noch nicht bekannt ist. Metavinculin hat jedoch distinkte biochemische Eigenschaften, die auf einen spezifischen Beitrag in muskulären Adhärenzverbindungen schließen lassen (Witt et al., 2004). Zudem gibt es Hinweise auf eine essentielle Rolle von Metavinculin in der strukturellen Integrität und Funktion des Herzens (Olson et al., 2002; Zemlijic-Harpe et al., 2004).

Raver1 wurde ursprünglich in einem "Yeast Two-Hybrid-Screen" als Ligand der Metavinculin-Schwanzdomäne identifiziert. (Abb. 3). Die Bindung an die Vinculinschwanzregion wurde ebenfalls nachgewiesen, die Bindungsaffinität ist im Vergleich zu Metavinculin jedoch deutlich geringer.

Es wurde gezeigt, dass Raver1 mit Vinculin in den Costameren, den Verankerungspunkten der Z-Scheiben mit der Plasmamembran, quergestreifter Muskulatur kolokalisiert (Hüttelmaier et al., 2001).

1.2.2.3 α -Actinin

α -Actinine sind eine hochkonservierte Familie Aktin-bindender Proteine mit einer hohen funktionellen Diversität. Diese Diversität zeigt sich am stärksten bei Säugern, deren vier separate α -Actinin-codierende Gene mindestens sechs verschiedene α -Actinin-Isoformen hervorbringen können, wobei jede Isoform eine gewebespezifische Expression aufzeigt (Beggs et al., 1992; Honda et al., 1998; Southby et al., 1999; Mills et al., 2001).

α -Actinin ist ein antiparalleles, stabförmiges Homodimer (~ 100kDa pro Untereinheit) mit einem aus zwei Calponin-Homologie-Domänen gebildeten, Aktin-bindendem „Kopf“ am N-Terminus jedes Monomers (Abb. 6), wodurch die Quervernetzung von Aktinfilamenten ermöglicht wird. Vier zentrale Spectrin-repeats werden gefolgt von einer aus zwei EF-Hand Domänen bestehenden C-terminalen

Region. Diese Region zeigt zwischen den α -Actinin-Isoformen die größte funktionelle Divergenz. Die EF-Domänen der cytoskelettalen, nicht-Muskel Isoformen binden Calcium, wodurch u.a. die Kinetik der Aktinbindung reguliert wird (Tang et al., 2001). Durch Deletionen ist diese Ca-Regulation bei allen bisher charakterisierten Muskelisoformen eliminiert, so dass Ca-insensitive Proteine gebildet werden. Diese bilden in Skelettmuskeln eine entscheidende Komponente der sarkomeren Z-Linie gestreifter Muskulatur (Blanchard et al., 1989; Squire, 1997), indem sie die Aktin-enhaltenden dünnen Filamente verankern und so den kontraktilel Apparatur stabilisieren. Somit ist α -Actinin nicht wie Vinculin auf den peripheren Part der Z-Linie beschränkt, sondern ist ein integraler Baustein dieser Struktur.

Darüber hinaus konnte α -Actinin auch in Membran-assoziierten "dense plaques" und cytoplasmatischen "dense bodies" von Glattmuskeln, in "intercalated discs" von Herzmuskeln und in Adhärenzverbindungen von Nichtmuskel-Zellen nachgewiesen werden (Blanchard et al., 1989). Somit ist α -Actinin ein Bestandteil vieler Zelladhäsionsstrukturen, in denen das Protein u.a. durch die Verknüpfung von Transmembranproteinen wie beispielsweise Integrinen mit dem Aktincytoskelett als ein weiteres Ankerprotein wirkt (Otey et al., 1990; Carpen et al., 1992).

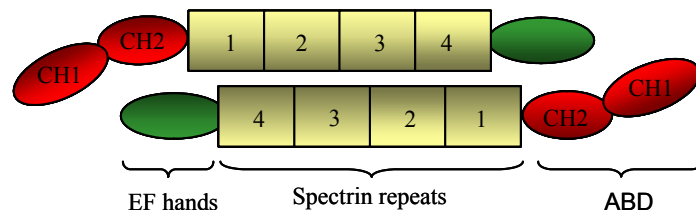


Abbildung 6: Schematische Darstellung von α -Actinin (nach Fray et al., 2003)

α -Actinin besitzt eine N-terminale, aus zwei Calponin-Homologie-Domänen (CH1, CH2) aufgebaute, Aktin-Bindedomäne (ABD), zwei C-terminale EF-Hand-Domänen und vier zentrale Spectrin-repeats (1-4), welche die Bildung eines antiparallelen Dimers vermitteln. Die hantelförmige Struktur des Dimers ermöglicht die Bündelung von Aktinfilamenten.

"Yeast Two-Hybrid"- Analysen belegen, dass die Interaktion von α -Actinin mit Raver1 wahrscheinlich über die C-Termini beider Proteine erfolgt. Die Kollokalisierung von Raver1 und α -Actinin konnte in immunhistochemischen Untersuchungen von Mausmuskeln im Bereich der Z-Linie gezeigt werden (Hüttelmaier et al., 2001).

1.2.3 Die zelluläre Bedeutung von Raver1

Über die genaue zelluläre Funktion von Raver1 kann bisher nur spekuliert werden. Allerdings legen die bisherigen Beobachtungen die Vermutung nahe, dass Raver1 als Mediator zwischen Zellkern und Aktin-assoziierten Adhärenzverbindungen fungiert.

Die Tatsache, dass Raver1 der Familie der hnRNPs zugeordnet werden kann lässt auf eine Beteiligung an der RNA-Prozessierung und/oder dem Transport von mRNAs schließen (Abb. 7, Jockusch et al., 2003). Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Raver1 an der Prozessierung von mRNA ergaben sich aus dem Befund, dass Raver1 das PTB-vermittelte Spleißen des α -Tropomyosin-Gens beeinflusst (Kapitel 1.2.2.1). *In vitro* verstärkt Raver1 die PTB-abhängige Repression von Exon 3 des α -Tropomyosins und begünstigt dadurch die Erzeugung der Glattmuskel-spezifischen Tropomyosin-Isoform, die das alternative Exon 2 enthält (Gromak et al., 2003). In der bisherigen Modellvorstellung wird davon ausgegangen, dass Raver1 über die PTB-Bindungsregion an Prä-mRNA rekrutiert wird und daraufhin die C-terminale Region von Raver1 als Repressor der angrenzenden Spleißstelle wirkt (Gromak et al., 2003). Generell ist neben dem Spleißen von α -Tropomyosin die Beeinflussung weiterer alternativer Spleißvorgänge denkbar. Eine direkte, nicht PTB-vermittelte RNA-Bindung von Raver1 konnte bisher nicht überzeugend gezeigt werden.

Die beobachtete Translokation von Raver1 aus dem Zellkern ins Cytoplasma geht mit Differenzierungsprozessen einher, die in Muskelzellen mit der Expression verschiedenster Muskel-spezifischer Spleißvarianten verbunden sind (Hüttelmaier et al., 2001). Raver1 wird vermutlich über die Mikrofilament-assoziierten Proteine Vinculin, Metavinculin und α -Actinin in die Adhäsionsstrukturen quergestreifter Muskulatur rekrutiert. Es ist fraglich, ob Raver1 eine essentielle Strukturkomponente dieser Adhäsionsstrukturen ist, denn "knock-out" Mäuse weisen keinen schwerwiegenden Phänotyp auf und zeigen eine histologisch unauffällige Muskulatur (unveröffentlichte Ergebnisse M. Fabienke, B. Kleinhenz). Da hnRNP-Proteine jedoch häufig am gerichteten Transport spezifischer mRNAs beteiligt sind (Krecic & Swanson, 1999), könnte Raver1 durch den gezielten Transport von mRNA indirekt Einfluss auf die molekulare Architektur muskulärer Adhärenzverbindungen nehmen (Jockusch et al., 2003, Abb. 7). Die spezifische Lokalisation von mRNA konnte in einer Vielzahl von Fällen, beispielsweise in Oocyten, in den frühen Embryonen von Vertebraten und Insekten und in Hefen, bereits nachgewiesen werden (Bassell et al., 1999; Palacios et al., 2001). Auch in der Muskulatur scheint die lokale Translation spezifischer mRNAs von Bedeutung zu sein, da gezeigt werden konnte, dass verschiedene mRNAs, darunter Desmin und Vinculin, in den Costameren embryonaler Muskeln lokalisiert werden (Morris & Fulton, 1994). Eine Beteiligung von Raver1 an diesen Prozessen wäre durchaus denkbar.

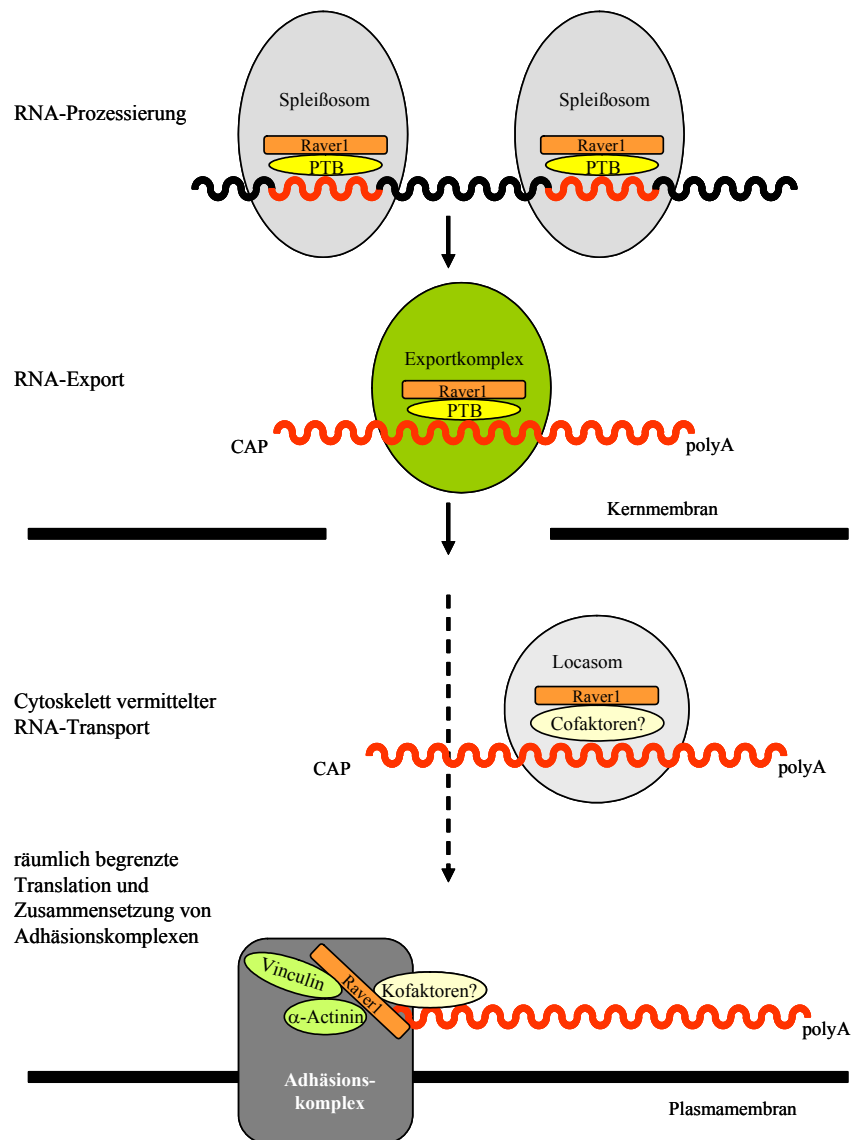


Abbildung 7: Hypothetisches Modell zur Raver1-Funktion (modifiziert nach Jockusch et al., 2003)

Mutmaßlich ist Raver1 im Zellkern an der PTB-vermittelten RNA-Prozessierung innerhalb des Spleißosoms beteiligt. Beide Proteine könnten Bestandteil eines Transportkomplexes sein, welcher die gereifte mRNA ins Cytoplasma transportiert. In spezialisierten Komplexen, sog. Locasomen, könnte Raver1 zusammen mit Kofaktoren entlang des Cytoskeletts zur Zellperipherie und Adhäsionskomplexen transportiert werden. Mittels Bindung an die Ankerproteine Vinculin und α -Actinin ist die Raver1-vermittelte Verankerung von mRNA an den Adhäsionskomplex, die räumlich begrenzte Translation und schließlich die Zusammensetzung des Komplexes denkbar.

1.3 Ziel der Arbeit

Das "dual compartment" Protein Raver1 ist ein Mitglied der hnRNP-Familie, über dessen zelluläre Funktion bisher wenig bekannt ist. Für das wahrscheinlich differenzierungsabhängig pendelnde Protein konnten in "Yeast Two-Hybrid"-Analysen das verwandte hnRNP PTB sowie die Mikrofilament-assoziierten Proteine Vinculin, Metavinculin und α -Actinin identifiziert werden. Bestätigt wurden diese Befunde bisher für das *in vitro* translatierte Protein und durch Immunpräzipitation aus eukaryotischen Zellen. Beide experimentellen Ansätze können jedoch nicht ausschließen, dass *in vivo* eine Assoziation von Raver1 mit diesen Liganden eher indirekt erfolgt, da sowohl PTB als Bestandteil von Ribonukleoprotein-Partikeln (RNPs) als auch die Aktin-assoziierten Liganden von Raver1 in Multiproteinkomplexe eingebunden sind.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung eines Expressions- und Aufreinigungsverfahrens für das Raver1 Protein und ausgesuchte Deletionsfragmente, um eine biochemische Charakterisierung zu ermöglichen. Zunächst sollten dabei die bekannten Liganden auf eine direkte Interaktion hin überprüft werden. Darüber hinaus sollten erste Untersuchungen zu möglichen Regulationsmechanismen am rekombinanten Protein durchgeführt werden. In Anlehnung an die für die Raver1-Liganden beschriebenen Regulatoren sollte dabei auf eine eventuelle Phosphorylierung getestet werden.

Ein zweiter Aspekt dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Raver1 Liganden, um weitere Hinweise auf die zelluläre Bedeutung von Raver1 zu erlangen. Zwei experimentelle Ansätze sollten hierbei verfolgt werden. Zum einen sollten Muskel-cDNA-Banken in "Yeast Two-Hybrid"-Analysen nach neuen Bindungspartnern durchsucht werden, zum anderen sollten native Proteinkomplexe aus eukaryotischen Zellen isoliert und analysiert werden.

Schließlich sollten die zellulären Analysen auf weitere Gewebe ausgeweitet werden, um die Hypothese zu überprüfen, inwieweit Raver1 tatsächlich in muskulärem Gewebe verstärkt aus dem Zellkern in das Cytoplasma exportiert wird und wo das Protein dort genau lokalisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Airfuge:	Beckman, Fullerton, Californien, USA
CCD-Kamera:	VarioCam Intas, PCO Computer Optics GmbH
Cryotom:	Frigocut 2800, Leica, Braunschweig
ELISA-Reader:	MRX, Dynatech Lab., Denkendorf
FPLC:	Pharmacia, Freiburg
Geldokumentationsanlage:	Herolab GmbH, Wiesloch
Heizblock:	DRI-Block DB-2A, Techne
Heizrührer:	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
Inkubatoren:	Jouan EB280 Steri-Cult200, Forma Scientific, Ohio, USA
Mikroskope:	Fluoreszenzmikroskop Axiophot, Zeiss, Göttingen Invertmikroskop Telafal 31, Zeiss, Göttingen
Schüttelinkubator:	Certomat, Sartorius BBI Systems, Melsungen
Photometer:	UV 1202, Shimadzu
Sequenzierer:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Weiterstedt
Software:	Metamorph Systems, Adobe Photoshop 7.0, Microsoft Office XP, Lasergene DNASTar
Thermocycler:	Thermocycler MJ Research, MWG, Ebersberg
Ultraschallgerät:	Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA
UV-Leuchttisch:	E.A.S.Y. RH, Herolab GmbH, Wiesbaden
Vortex Genie TM 2:	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen:	Kühlzentrifuge J2-MC, Beckman, Krefeld Kühlzentrifuge 3K15, Sigma, Osterode am Harz Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau Tischzentrifuge 113, Sigma, Osterode am Harz

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Difco (Hamburg), ICN (Eschwege) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Bezugsquelle für Enzyme waren, sofern nicht anders vermerkt, die Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Appligene (Heidelberg), PAA Laboratories (Cölbe) und Promega (Mannheim).

2.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen, und wurden hauptsächlich für Sequenzierungen verwendet. Sie sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Sequenzierungsoligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz
1	T7	AATACGACTCACTATAG
2	Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
3	Raver1A2 (52 SH)	CTCTTCCGGATCGAGCGGCGGC
4	Raver1r2 (34 SH)	CAGTACTTGAGTTCGTAGTCGC
5	Raver1f118 (98SH)	GGAACCTCTATGTGGACGGCC

2.1.4 Genbanken

Für die „Yeast Two-Hybrid Screens“ wurden folgende Genbanken (Clontech) verwendet:

- „Human Heart MATCHMAKER cDNA Library“
- „Human Aorta MATCHMAKER cDNA Library“

2.1.5 Vektoren

Die Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* erfolgte mit dem Vektor pQE30 (Qiagen). Dieser Vektor beinhaltet einen durch IPTG induzierbaren Promotor, der die Expression des inserierten DNA-Fragmentes als Fusionsprotein mit sechs N-terminalen Histidinen bewirkt. Über diesen His-tag können die Fusionsproteine affinitätschromatographisch mittels einer Nickel-NTA-Matrix aufgereinigt werden.

In Einzelfällen wurde für die Expression rekombinanter Proteine auch der Vektor pmal-c2 (Invitrogen) eingesetzt. Auch in diesem Fall lässt sich die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG induzieren. Es entsteht jedoch ein Fusionsprotein, das am N-Terminus das sogenannte MBP („Maltose-Binding Protein“) aus *E.coli* trägt. Dies ermöglicht die Aufreinigung der entsprechenden Proteine über eine Amylosematrix.

Bei der Expression rekombinanter Proteine unter Verwendung des Bac-to-Bac[®] Baculovirus-Expressionssystems wurde der pFastBac[™]-Vektor (Invitrogen) eingesetzt. Die so exprimierten rekombinanten Proteine waren mit einem His-"tag", um die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose zu ermöglichen (Kapitel 2.2.5.4), und einem FLAG-"tag", der zur Detektion der Proteine diente, versehen.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Proteinen in kultivierten eukaryotischen Zellen kam insbesondere der Vektor pEGFP-C2 (Clontech) zum Einsatz. Dieser Vektor trägt am 5'-Ende der MCS die Sequenz für das sogenannte EGFP („Enhanced Green Fluorescent Protein“). Nach dem Einbringen der Vektor-DNA in Zellen entsteht so ein Fusionsprotein, das N-terminal einen GFP-Fusionsanteil trägt. Dieser fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht und ermöglicht so die Untersuchung der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins ohne den Einsatz spezifischer Antikörper.

Sollte ein Protein in kultivierten Zellen auf Lokalisation oder aber auch in Immunpräzipitationsexperimenten auf die Bildung von Komplexen untersucht werden, wurde zumeist der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 verwendet. Zur Vereinfachung der Handhabung der zu untersuchenden Proteine wurde der Vektor zusätzlich mit einem Fusionsanteil („tag“) versehen. Dabei handelt es sich um kurze Nukleotidsequenzen, die im Leseraster vor die MCS des Vektors über Ligation eingebracht wurden. Diese kodieren für kurze Aminosäuresequenzen, die nach Einbringen des Vektors in die Zelle als N-terminaler Fusionsanteil des Proteins vorliegen und mit vorhandenen, spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Verwendet wurde zum einen der sogenannte BiPro-„tag“, der aus einer kurzen Aminosäuresequenz des Proteins Profilin aus der Birke besteht. Dieser kann durch einen entsprechenden monoklonalen Antikörper (4A6, Rüdiger et al., 1997; Wiedemann et al., 1996) spezifisch nachgewiesen werden. Andererseits kam auch der sogenannte FLAG-Epitop-„tag“ zum Einsatz, gegen den Antikörper käuflich zu erwerben sind (siehe Kapitel 2.1.6).

„Yeast Two-Hybrid“ Analysen wurden mittels der Vektoren pGAD-T7 und pGBK-T7 (Clontech) durchgeführt. Eine genauere Beschreibung der Vektoren findet sich in Kapitel 2.2.21.

2.1.6 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper und Toxine sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper

EH: Eigene Herstellung (Sabine Buchmeier, AG Jockusch), WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz, CS: Cryoschnitt

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Art	Verdünnung
α -FLAG (M2)	FLAG-Epitop-„tag“	Sigma	Maus	monoklonal	1:5000 (WB) 1:5000 (ELISA) 1:1000 (IF)
α -BiPro (4A6)	BiPro-Epitop-„tag“	EH	Maus	monoklonal	1:100 (WB)
6E3	Metavinculin-Einschub-Peptid	EH	Maus	monoklonal	Unverdünnt (IF), 1:10 (WB) Unverdünnt (ELISA)
5G6	Raver1	EH	Maus	monoklonal	1:10 (CS) 1:2 (WB), 1:2 (ELISA), 1:10 (IF)
5D5	Raver1	EH	Maus	monoklonal	Unverdünnt (CS), 1:5 (IF), 1:2 (WB)
7D3	Raver1	EH	Maus	monoklonal	Unverdünnt (CS), 1:5 (IF), 1:2 (WB)
2D12	Raver1	EH	Maus	monoklonal	Unverdünnt (CS), 1:5 (IF), 1:2 (WB)
2G2	Aktin	EH	Maus	monoklonal	1:2 (WB)
α -Aktin	Aktin	Sigma	Kaninchen	polyklonal	1:200 (WB)
α -Tetra-His	His-„tag“	Qiagen	Maus	monoklonal	1:800 (WB)
hVin1	Vinculin-Kopf	Sigma	Maus	monoklonal	1:2000 (WB), 1:200 (IF)
α -Actinin	α -Actinin	Sigma	Maus	monoklonal	1:5000 (WB)
α -Actinin	α -Actinin	Sigma	Kaninchen	polyklonal	1:500 (WB)
PIP ₂ -Antiserum	PIP ₂	Assay Designs	Maus	monoklonal	1:125 (ELISA)
BB7	PTB	C. Smith, Cambridg, UK	Maus	monoklonal	1:2 (WB)

Tabelle 3: Zusammenfassung aller eingesetzten Zweitantikörper und anderer verwendeter Agenzien
WB: Western-Blot, IF:Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Antigen	Quelle	Organismus	Verdünnung
α -mouse-IgG-HRP	Maus IgG	Sigma	Schaf	1:5000 (WB/ELISA)
α -rabbit-IgG-HRP	Kaninchen IgG	Sigma	Ziege	1:5000 (WB/ELISA)
α -mouse IgG-AP	Maus IgG	Sigma	Kaninchen	1:3500 (WB)
α -mouse IgG-FITC	Maus IgG	Sigma	Ziege	1:50 (IF)
α -mouse IgG-TRITC	Maus IgG	Sigma	Ziege	1:100 (IF)
α -rabbit IgG-Alexa Fluor 594	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:300 (IF)
α -mouse IgG-Alexa Fluor 568	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:300 (IF)
α -rabbit IgG-Alexa Fluor 488	Kaninchen IgG	Molecular Probes	Ziege	1:250 (IF)
α -mouse IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG	Molecular Probes	Ziege	1:250 (IF)
Cy TM 3 –conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Maus IgG	Jackson Immuno Research	Ziege	1:200 (CS)
Phalloidin-FITC	-	Sigma	-	1:50 (IF); 1: 75 (CS)
Phalloidin-TRITC	-	Sigma	-	1:100 (IF)
DAPI		Applichem		1:1000

2.1.7 Organismen

2.1.7.1 Bakterien

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden die *Escherichia coli*-Stämme *XL1-blue* und *M15(pREP4)* eingesetzt. Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

XL-1 blue supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi rel A1 lac⁻ F' [pro AB⁺ lacI^q LacZ Δ M15 Tn10(tet^r)]

M15(pREP4) Nal^S, Str^S, Rif^C, Thi⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺ (Villarejo & Zabin, 1974)

BL21 F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm, met (DE3), pLysS(Cam^R) (Studier & Moffat, 1986)

TunerTM F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm, lacY1

RosettaTM F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm, pRARE² (Cam^R)

BL21 OrigamiTM Δ (ara-leu)7697, Δ lacX74, Δ phoA, PvuII, phoR, araD139, ahpC, galE, falK, rpsL, F⁻(lac⁺lacI)pro, gaor522::Tn10, trxB (Kan^R, Str^R, Tet^R)

Zur Anzucht von *E.coli* wurden folgende Medien verwendet:

2xYT-Vollmedium 16 g Trypton (Difco)
 10 g Hefeextrakt (Difco)
 10 g NaCl
 auf 1 l mit H₂O

LB-Medium (Luria Bertani) 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 auf 1 l mit H₂O

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 30 µg Kanamycin / ml oder 150 µg Ampicillin versetzt. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben.

2.1.7.2 Hefen

Die Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien des „Yeast Two-Hybrid“ Systems wurden mit den *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen AH109 und Y187 mit den folgenden relevanten Genotypen durchgeführt:

AH109 MAT_a, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::Gal1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3, Gal2_{UAS}-Gal2_{TATA}-ADE2, ura::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ (James et al., 1996)

Y187 MAT_α, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3::Gal1_{UAS}-Gal1_{TATA}-lacZ (Harper et al., 1993)

Als Standardmedium für die Anzucht von Hefezellen wurde YPD-Medium eingesetzt:

YPD-Medium 10 g Hefeextrakt
 20 g Pepton
 auf 950 ml mit H₂O
 nach dem Autoklavieren:
 Zugabe von 50 ml autoklavierter 40 % Glucose

Für YPD-Platten wurde das Medium vor der Zugabe der Glucose mit 2 % (w/v) Agar-Agar versetzt. Alle weiteren Medien für die Versuche des „Yeast Two-Hybrid“ Systems wurden dem Herstellerprotokoll (Clontech) entnommen.

2.1.7.3 Tierische Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Zelllinien verwendet:

C2C12	ATCC-Nr. CRL-1772; murine Myoblastenzelllinie (Yaffe & Saxel, 1977)
HeLaX1/5	ECACC-Nr. 95051229; humane Cervix-Karzinomzelllinie (Gossen & Bujard, 1992)
PTK2	ATCC CCL-56; Nierenepithelzellen der Beutelratte (<i>Potorous tridactylis</i>) (Walen, 1965;

Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Zellkulturgefäßen der Firma Nunc (Nunc, Wiesbaden) in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM), supplementiert mit 10 % Fötalem Kälberserum (FCS), bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert

DMEM:

- 13,38 g DMEM (PAA Laboratories, Cölbe)*
- 1,5 g NaHCO₃*
- 10 ml 0,2 M N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin (PAA Laboratories)*
- 100 ml FCS (PAA Laboratories, Cölbe)*
- auf 1 l mit H₂O_{dest.}*

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung Calciumchlorid-kompetenter Bakterien

Vor der Transformation müssen die Bakterienzellen für die Aufnahme von Fremd-DNA vorbereitet, kompetent gemacht werden. Hierbei wird die Bakterienoberfläche derart verändert, dass Fremd-DNA daran binden kann. Die Kompetenz wird bei *E.coli* durch die Inkubation der Bakterien aus der frühen log-Phase in CaCl₂ erreicht.

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen wurden 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:50 mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *E.coli*-Stammes angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} = 0,5) bei 30°C und 220 rpm kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Kultur wurde 5 min bei 6000 rpm abzentrifugiert, das

Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 30 min inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Das Pellet wurde danach in 2,5 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für mindestens 10 min inkubiert. Dieser Suspension wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % zugefügt. Zur Aufbewahrung wurden die kompetenten Bakterien aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Transformation kompetenter Zellen

100 μl kompetenter Zellen wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut, mit 0,1-1 μg Plasmid-DNA bzw. 7 μl Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 90 s, die die Aufnahme der Fremd-DNA fördert. Nach Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für 2 min wurden zur Regeneration der Zellen 500 μl antibiotikafreies Medium hinzugegeben und für 30 min bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 6000 rpm wurden die Bakterien geerntet und in 100 μl Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde im analytischen Maßstab aus transformierten *E.coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse aufgereinigt (Birnboim & Doly, 1979). Die Bakterien wurden zunächst mit EDTA und SDS unter Zugabe von NaOH aufgeschlossen. Im stark basischen pH-Bereich werden Proteine und hochmolekulare genomische DNA denaturiert, während Plasmide im ringförmigen oder „supercoiled“ Zustand verbleiben. Durch schnelle Zugabe von Ammoniumacetat entsteht ein schwer löslicher Komplex aus genomischer DNA, der zusammen mit den denaturierten Proteinen und Zelltrümmern bei der Zentrifugation sedimentiert. Aus dem plasmidhaltigen Überstand wurde die gelöste Plasmid-DNA mit Isopropanol ausgefällt, verbleibende Salze wurden durch Waschen mit 70% Ethanol entfernt.

3 ml einer Übernachtskultur wurden für 2 min bei 6000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 μl Lösung I aufgenommen. 300 μl Lösung II wurden hinzupipettiert. SDS und NaOH lösen die Zellmembran auf und setzen den Zellinhalt frei. Um Zelltrümmer, Proteine, RNA und genomische DNA zu präzipitieren wurden 300 μl Lösung III zugegeben und vermischt. Es wurde 10 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus) abzentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation wurde wiederholt. Die in der wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7-fachen

Volumen Isopropanol durch 15-minütige Zentrifugation präzipitiert. Im Anschluss wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Tris/HCl, pH 8
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A

Lösung II: 200 mM NaOH
 1 % SDS

Lösung III: 3 M KaAc, pH 5,5

2.2.1.4 Plasmid-Midi- bzw. Maxi-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA mit dem *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen, Hilden) erfolgt durch Ionenaustauschchromatographie. Ein spezielles hydrophiles Trägermaterial gewährleistet durch sein Ausschlussvolumen von ca. 100 µm und eine hohe Oberflächendichte von DEAE-Gruppen eine Trennung der Plasmid-DNA von Proteinen und Polysacchariden.

Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Herstellerangaben.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und der Grad der Verunreinigung durch Proteine und Phenol wurden spektrophotometrisch durchgeführt.

Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäure-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml (oder 40 µg/ml RNA) bei einer Schichtdicke von 1 cm. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der Peptidbindung und Phenol) bestimmt. Der Quotient oD_{260nm}/oD_{280nm} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch Verunreinigungen mit Proteinen wird dieser Quotient zu kleineren Werten verschoben.

2.2.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind natürlicherweise in Bakterien vorkommende DNAsen, die dem Abbau von Fremd-DNA dienen. Restriktionsendonukleasen binden spezifisch an zumeist palindromartig angeordnete DNA-Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiesterbindungen.

Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 0,5-2 µg DNA verwendet. Bei präparativen Anwendungen wurden 2-5 µg DNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl mit 0,1-1 U Enzym/µg DNA (1 Unit Spaltung von 1 µg DNA/h).

Verwendet wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs mit den jeweils empfohlenen 10x Puffern. Die Reaktion wurde entweder durch Zugabe von Probenpuffer oder durch Hitzeinaktivierung abgestoppt.

2.2.1.7 Ligation

Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen DNA-Fragmenten katalysiert. Als Cofaktoren werden bei eukaryotischen DNA-Ligasen ATP, bei prokaryotischen NAD zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Boehringer, Appligene, NEB) verwendet. Vektor-DNA (50-150 ng) und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 3:7 mit 1 µl Ligase in einem Reaktionsvolumen von 15 µl für 1 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert.

Die Ligation wurde in einem Endvolumen von 15 µl durchgeführt (Insert und 0,1-0,5 µg Vektor in einem Verhältnis von etwa 3:1, 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 1 U T4 DNA-Ligase). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C oder 1 h bei RT. Der Ligationsansatz wurde im Anschluss direkt in *E.coli* transformiert.

2.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Die von Sanger entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung doppelsträngiger DNA läuft ähnlich einer PCR ab (Sanger et al., 1977). Es wird dabei jedoch nur ein Primer verwendet. Zusätzlich zu den in einem gewöhnlichen PCR-Ansatz vorhandenen Desoxynukleotiden (dNTPs) werden bei einer Sequenzierung in geringer Menge Didesoxynukleotide (ddNTPs) eingesetzt, welchen die 3'-OH-Gruppe fehlt. Durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide über die PCR kommt es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, denn das Fehlen des notwendigen 3'-OH-Endes verhindert die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung.

Die vier verwendeten Didesoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass alle Fragmente, deren Synthese durch den Kettenabbruch gestoppt wird, an ihrem Ende in Abhängigkeit des jeweiligen Nukleotids einen dieser Farbstoffe tragen. Bei Anregung mit einem Laserstrahl weisen sie entsprechend unterschiedliche Emissionsspektren auf und können mit Hilfe des ABI Prism TM 310 Genetic Analyzers detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgt automatisch über die zugehörige Software.

Zunächst wurde eine PCR mit einem Premix (PE Applied Biosystems) durchgeführt, in welchem Desoxynukleotide, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide sowie Taq-DNA-Polymerase enthalten waren. Als Template diente möglichst saubere Plasmid-DNA.

Zusammensetzung der Sequenz-Reaktion:

Plasmid DNA:	50 ng
Premix :	2 µl
Oligonukleotid :	5 pmol
H ₂ O:	auf 10 µl

Nach erfolgter PCR wurden 10 µl H₂O, 2 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5) und 55 µl 100 % Ethanol zur Entfernung überschüssiger Primer, Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide zugefügt und zentrifugiert (13000 g, 30 min). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 12,5 µl "Template Suppression Reagent" (PE Applied Biosystems) gelöst. Nach 2-minütiger Denaturierung bei 90°C konnte die Probe zur Sequenzierung eingesetzt werden.

2.2.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Dabei bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in der Matrix des Gels mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zur Anode. Je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente wurde die Agarosekonzentration des Gels so gewählt, dass eine optimale Auftrennung im gewünschten Bereich vorlag. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 0,5 x TBE-Puffer durch Kochen gelöst, nach Abkühlen auf 60°C in eine Gelkammer gegossen. Pro Gel wurden 4 µl einer Ethidiumbromidlösung in die Kammer gegeben und mit der hinzugegebenen Agaroselösung durch Rühren möglichst gleichmäßig vermischt. Taschen zum Auftragen der Proben wurden durch einen eingesetzten Kamm geformt. Die DNA-Proben wurden mit 5 x Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte in 0,5 x TBE bei 1-10 V/cm.

Nach Interkalation in die DNA-Moleküle fluoresziert Ethidiumbromid unter UV-Licht. Nach der Auftrennung lassen sich die Größe sowie ungefähre DNA-Mengen durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Eichstandard bestimmen. Als Molekulargewichtsstandard wurde durch die Restriktionsenzyme EcoRI und Hind III gespaltene DNA des Lambda-Phagen verwendet.

0,5 x TBE: *45 mM Tris/Cl, pH 8*
 0,045 % Borsäure
 2 mM EDTA

2.2.1.10 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und im Anschluss unter Zuhilfenahme des „Qiaquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinbestimmung

2.2.2.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 bestimmt (Bradford, 1976). Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen, wahrscheinlich mit Argininresten und bildet Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweisen, während ungebundener Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Da die Absorptionsänderung über einen großen Bereich linear von der Proteinkonzentration abhängt, ist es möglich, die Konzentration von Proteinlösungen zu ermitteln.

20 µl Proteinlösung wurde in einer 96-Loch-Platte mit 100 µl Bradford-Reagenz versetzt und nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 595 nm photometrisch mittels eines ELISA-Readers gemessen. Anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA-Konzentration zwischen 10-150 µg Protein/ml) wurde die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.2.2.1.2 Densitometrische Proteinbestimmung

Da es für die vergleichende Charakterisierung Vinculins und Metavinculins unerlässlich ist, dass gleiche Proteinmengen miteinander verglichen werden, wurde die Konzentration beider Proteine zusätzlich densitometrisch ausgewertet. Dazu wurden definierte Mengen der Proteine zusammen mit definierten Mengen Aktin auf ein SDS-Gel geladen. Das Coomassie Brilliant Blue-gefärbte Gel wurde densitometrisch ausgewertet und die Konzentrationen der Proteine konnten aus den Absorptionswerten

und ihrem Molekulargewicht berechnet werden. Zusätzlich ermöglicht die Methode einen direkten Vergleich bezüglich der Qualität aller zu bestimmenden Proteine.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine können durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Nettoladung der Proteine wird dabei durch das negativ geladene SDS kompensiert. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem Trenngel, das mit einem niedrigprozentigen Sammelgel (4%) überschichtet wurde. Die Prozentigkeit der Trenngele richtete sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine und lag im Bereich von 7-15 %.

2.2.2.2.1 Herstellung der Gele

Die mit Ethanol gesäuberten Glasplatten wurden zusammengebaut, das Trenngel wurde in den durch die „spacer“ geschaffenen Spalt gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Acrylamids wurde das Isopropanol dekantiert, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt.

Zusammensetzung des Trenngels (Angabe in ml):

	10,0 %	12,5 %	15 %
Acrylamid	10	12,5	15
Trenngelpuffer	7,5	7,5	7,5
H ₂ O	12,4	9,9	7,4
TEMED	0,01	0,01	0,01
APS	0,2	0,2	0,2

Zusammensetzung des Sammelgels:

Substanz	Volumen (ml)
Acrylamid	1,3
Sammelgelpuffer	2,5
H ₂ O	6,2
TEMED	0,01
APS	0,2

<i>Acrylamidlösung:</i>	<i>30 % Acrylamid</i> <i>0,8 % Bisacrylamid</i>
<i>Trenngelpuffer:</i>	<i>1,5 M Tris/Cl, pH 8,8</i> <i>0,4 % SDS</i>
<i>Sammelgelpuffer:</i>	<i>0,5 M Tris/Cl, pH 6,8</i> <i>0,4 % SDS</i>
<i>APS:</i>	<i>10 % Ammoniumpersulfatlösung</i>

2.2.2.2 Elektrophorese

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5-fach Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die Taschen geladen. Das Gel lief zunächst bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA (Sammelgel), dann bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA (Trenngel). Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse mittels Semi-Dry-Blot (Kapitel 2.2.2.3) auf eine Membran transferiert oder im Gel direkt mit einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung nachgewiesen. Dazu wurde das SDS-Gel 30-60 min in Färbelösung schwenkend bei RT inkubiert. Anschließend wurde mittels Entfärber-Lösung überschüssiger Farbstoff entfernt, bis die Banden deutlich kontrastiert erkennbar waren.

Als Größenstandards dienten „low molecular weight marker“ (LMW) und „high molecular weight marker“ (HMW) von Sigma.

<i>5-fach-Probenpuffer:</i>	<i>375 mM Tris/Cl, pH 6,8</i> <i>2 % SDS</i> <i>12 % Glycerol</i> <i>0,05 % Bromphenolblau</i> <i>10 % β-Mercaptoethanol</i>
<i>Coomassielösung:</i>	<i>10 % Eisessig</i> <i>25 % Isopropanol</i> <i>0,025 % Coomassie Brilliant Blue</i>
<i>Entfärbelösung:</i>	<i>10 % Eisessig</i> <i>12,5 % Isopropanol</i>

2.2.2.3 „Semidry“ Western-Blot

Zum Transfer der in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulose-Trägermembran wurde ein semi-dry-Verfahren angewendet. Die Gele wurden nach dem Lauf kurz in Blotpuffer äquilibriert und der Blot wurde wie zuvor beschrieben (Hüttelmaier 1997) aufgebaut. Geblottet wurde bei einer Stromstärke von 2-3 mA/cm² (etwa 100 mA pro Minigel) für 1 – 1,5 h. Anschließend wurde zur Kontrolle des Protein-Transfers und zur Kennzeichnung der Markerbanden eine durch Wasser reversible Ponceau-Rotfärbung durchgeführt.

Blotpuffer: 150 mM Glycin
 25 mM Tris/HCl, pH 8,5
 10 % Methanol

2.2.2.3.1 Nachweis von immobilisierten Proteinen mit Antikörpern

Zum Nachweis von immobilisierten Proteinen auf Nitrocellulose-Trägermembranen wurden Primärantikörper eingesetzt, die mit Hilfe von Enzym-gekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörpern dargestellt werden konnten. Hierdurch erreicht man eine Signalverstärkung, da polyklonale Antikörper mehrere Epitope eines Primärantikörpers besetzen und selbst geringste Proteinmengen können nachgewiesen werden.

Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in TBST zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Das Milchpulver wurde durch kurzes Waschen mit 1x TBST-Puffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem in TBST + 1% BSA entsprechend verdünnten Erstantikörper für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nicht gebundene Primärantikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt, bevor der gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper (verdünnt in TBST + 1% BSA) für 30-60 min bei RT zugegeben wurde.

Der Blot wurde mehrmals mit TBST und einmal für mindestens 15 min mit TBSX gewaschen.

HRP-Entwicklung

Der Nachweis der mit Peroxidase (HRP = horseradish-peroxidase) gekoppelten Zweitantikörper erfolgte meist mit dem „Enhanced Chemiluminescence System“ (ECL, Amersham). Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst dabei Chemilumineszenz aus. Das dabei entstehende Licht färbt den auf den Blot aufgelegten Röntgenfilm. Zur ECL-Entwicklung wurden ECL-Lösung I und ECL-Lösung II nach Herstellerangaben in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und der Blot darin

für 1 min inkubiert. Überschüssiges ECL-Reagenz wurde auf einem Whatmanpapier abgestreift, der Blot wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und auf einen ECL-Film aufgelegt.

I x TBST: 20 mM Tris / HCl, pH 8,8
 140 mM NaCl
 0,1 % Tween-20

I x TBSX : 20 mM Tris / HCl, pH 8,8
 140 mM NaCl
 1 % Triton-X-100

2.2.2.4 ELISA („Enzyme Linked Immunosorbent Assay“)

Der ELISA wurde als „solid phase binding assay“ eingesetzt, um *in vitro* die Interaktion zweier Moleküle zu untersuchen. Nach der Adsorption eines Proteins an der Oberfläche einer Mikrotiter-Platte erfolgte die Inkubation mit dem zu testenden Molekül, welches wiederum durch den Einsatz spezifischer Antikörper nachgewiesen wurde.

In der Regel wurden 25 pmol Protein in Kopplungspuffer an ein well einer 96-well-Mikrotiter-Platte (Greiner Microlon / Nunc Polysorb) adsorbiert (4°C, üN). Alternativ kann die Kopplungsreaktion auch unter Pufferbedingungen stattfinden, die eher physiologischen Bedingungen entsprechen. Nicht gebundenes Protein wurde durch mehrmaliges Waschen der Platte mit 0,02% Tween in PBS entfernt. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit 1% BSA in ELISA-Puffer (200 µl, 2h, RT). Nach erneutem mehrmaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem zu untersuchenden Molekül (2h, RT). Ungebundene Moleküle wurden durch Waschen entfernt, gebundene Moleküle wurden mittels eines spezifischen Antikörpers markiert. Der ELISA wurde durch Verwendung eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers durch eine Farbreaktion entwickelt. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase diente dafür ABTS (2,2-Azinobis(3-Ethylbenzthiazolin-Sulfonsäure), Sigma) in ELISA-Entwicklungspuffer. Die Farbentwicklung wurde mit einem ELISA-Reader (Dynatech, Denkendorf) dokumentiert.

Kopplungspuffer: 50 mM NaHCO₃, pH 9,6
(1,59 g Na₂HCO₃ pro 1000 ml, 2,93 g NaHCO₃)

Citratpuffe:r

0,1 M Citronensäure (33 ml)

0,1 M Tri-Na-Citrat (17 ml)

50 ml H₂O

ELISA-Entwicklungslösung:

10 ml Citratpuffer
10 µl 30 % H₂O₂
100 µl ABTS (40 mM in H₂O)

2.2.2.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine wurden die Genkonstrukte in den modifizierten Baculovirus-Expressionsvektor pFASTBAC oder verschiedene bakterielle Expressionsvektoren (siehe Kapitel 2.1.5) eingebracht. Diese Vektoren ermöglichen es, das gewünschte Polypeptid mit einem N-terminalen Fusionsanteil [6 Histidine bzw MBP (maltose-binding-protein)] in Insektenzellen oder in *E.coli* zu exprimieren.

Der His-„tag“ bindet stark an Nickel-NTA-Agarose, wodurch sich eine einfache Aufreinigungsmethode ergibt. Zudem sind die Fusionsproteine N-terminal mit einem „FLAG“-tag versehen, welcher eine einfache Detektion der Proteine mittels α-FLAG-Antikörper im Western-Blot ermöglicht.

Die Expression in Insektenzellen wurde mit dem Bac-to-Bac™ (Invitrogen) Baculovirus-Expressionssystem durchgeführt.

Die Expression in *E.coli* erfolgte in den Stämmen M15 und BL21. Beide Stämme tragen das pRep4-Plasmid, welches für den lac-Repressor kodiert und zudem eine Kanamycinresistenz aufweist. Über dieses Plasmid lässt sich die Expression mit Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) kontrollieren, da es an den lac-Repressor bindet und ihn so inaktiviert.

2.2.2.5.1 Expressionskinetik

Um die Expression der Konstrukte in *E.coli* zu optimieren, wurden sog. Pilot-Experimente durchgeführt. Verschiedene Konstrukte wurden in kompetente *E.coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.2) und eine Vorkultur mit 2 X YT-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft. Aus diesen Vorkulturen wurden 15 ml Hauptkulturen angeimpft, die bei RT, 30°C und 37°C inkubiert wurden. Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0,7 – 1 erfolgte die Induktion der Proteinexpression. Nach 1, 2 und 3 h bzw. nach 24 h bei RT wurden Proben zu je 1 ml genommen und photometrisch bei 600 nm vermessen. Die Zellen wurden anschließend bei 1300 rpm pelletiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die zugesetzte Menge des Probenpuffers war dabei von der gemessenen optischen Dichte der Probe abhängig: bei einer OD_{600nm} = 1,0 wurde das

Pellet mit 100 µl Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden hiernach auf ein SDS-Gel aufgetragen, mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt, bzw. im Western-Blot analysiert.

2.2.2.5.2 Expression von rekombinanten Proteinen mittels Baculovirus-Expression in Insektenzellen

Zur Expression rekombinanter Raver1-Proteine in Insektenzellen wurde das Bac-to-Bac™-System (Invitrogen) verwandt, welches eine Baculovirus-vermittelte Übertragung von Fremd-Genen in diesen Zellen ermöglicht. Zunächst wurde ein Donor-Plasmid (pFastBac™1) mit der genetischen Information des zu synthetisierenden Proteins erzeugt und in den *E.coli* Stamm DH10Bac™ transformiert, der neben einem Helfer-Plasmid (pMOM7124) mit der genetischen Information für eine Transposase, auch das modifizierte Genom des Baculovirus enthält (Bacmid, bMOM14272). Durch die Transposition der genetischen Information aus dem Donor-Plasmid in das Bacmid wird das Baculovirus-Genom vervollständigt. Nach Selektion der entsprechenden Stämme erfolgte eine Aufreinigung der Bacmid-DNA, die anschließend mittels Transfektion in die Sf9-Insektenzellen eingebracht wurde. Die Isolation rekombinanter Baculoviren erfolgte mittels Selektion über die morphologische Veränderung der befallenen Zellen. Um einen Virus-Vorrat mit hohem Titer anzulegen, wurde das Baculovirus hiernach erneut amplifiziert und schließlich für die Expression rekombinanter Proteine in High Five™-Insektenzellen eingesetzt. Bereits nach 24h Expressionsdauer waren im Western-Blot deutliche Proteinbanden aller verwendeten Raver1-Konstrukte nachweisbar, die bei längerer Expressionszeit deutliche Abbaubanden aufwiesen. Daher wurde für alle Konstrukte ein Expressionszeitraum von 24h gewählt.

Die Expression rekombinanter Proteine mittels des Bac-to-Bac™-Systems wurde an der GBF Braunschweig von Dr. Joop van den Heuvel, Dr. Volker Jäger und Frau Anja Kobold durchgeführt.

2.2.2.5.3 Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli

Zur quantitativen Aufreinigung von Proteinen wurden die pQE30-Konstrukte in den *E.coli*-Stamm M15 transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.2). Es wurden 1-2 l Hauptkulturen (2 x YT-Medium mit Kana/Amp, 30 µg/µl L-Prolin, 5 µg/µl Thiamin, 0,2 % Glycerin) angeimpft, die bei 37°C unter ständigem Schütteln (220 rpm) inkubiert wurden. Bei OD = 0,7-1,0 erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG die Induktion und einer weiteren Inkubation bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase. Die Bakterien wurden im Anschluss durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt (6500 rpm) bei 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 20-40 ml Lysispuffer mit 1 mg/ml Lysozym sowie Proteaseinhibitoren und β-Mercaptoethanol resuspendiert und bei -80°C nach Zugabe von Chelate-P eingefroren.

2 x YT-Medium:	16 g/L Trypton 10 g/L Yeast-Extract 5 g/L NaCl
Proteaseinhibitoren:	AEBSF, 0,2 M in H ₂ O (1:500) PepstatinA, 1 mM in Ethanol (1:500) Leupeptin, 10 mM in H ₂ O (1:500) Trasylol, 2,8 mg/ml in H ₂ O (1:500)

2.2.2.5.4 Zellaufschluss und Proteinaufreinigung His-„tag“markierter Proteine über Ni-NTA-Agarose-Beads

Die mit einem His-„tag“ versehenen rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine binden hierbei über ihren N-terminalen Fusionsanteil bestehend aus 6 Histidinen an Nickel-Nitriloessigsäure (Nickel-NTA), welche wiederum an eine Matrix aus Agarose gebunden ist.

Um die rekombinanten Proteine unter nativen Bedingungen aufzureinigen, wurde das Zelllysats zunächst bei 37°C aufgetaut und sofort mit frischen Proteaseinhibitoren und β -Mercaptoethanol versetzt. Alle folgenden Schritte fanden auf Eis, bzw. bei 4°C statt. Die Zellen wurden per Ultraschall aufgeschlossen (4 x 30 s Intervalle bei 80 W) und anschließend 30 min bei 30000 g abzentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt befanden sich die löslichen Proteine im Überstand, der auf die zuvor durch zweimaliges Waschen mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Schwenken, welches die Bindung der Proteine an die Matrix erhöhen sollte. Um die Reinheit der Proteinproben zu erhöhen wurde zweimal mit Lysispuffer, zweimal mit Waschpuffer und zweimal mit Elutionspuffer ohne Histidin gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von Histidin im Überschuss zum Elutionspuffer. Nach jeweils einer kurzen Inkubationszeit (5-10 min) wurden 3 Elutionsfraktionen von je 2,5 ml gesammelt. Diese wurden mit einer Ponceau-Rotfärbung auf einer Nitrocellulosemembran voruntersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und mittels einer PD10-Säule in den gewünschten Puffer umpuffert. Um die Aufreinigung der Proteine zu verfolgen, wurden Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte genommen und im SDS-Gel aufgetragen.

Lysispuffer: 50 mM NaP, pH 8
 300 mM NaCl
 25 mM Imidazol
 0,5 % Tween 20
frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol, 1 mg/ml Lysozym

Waschpuffer: 50 mM NaP
 300 mM NaCl
 0,5 % Tween 20
 8,7 % Glycerin
frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 50 mM NaP, pH 6,7
 100 mM KCl
 0,5 mM EGTA
 25 mM EDTA
 0,1 % Triton-X-100
 (150 mM Histidin)
frisch: Proteaseinhibitoren, β -Mercaptoethanol

Tabelle 4: Zusammenfassung aller relevanten Daten für die am häufigsten Eingesetzten bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine

Konstrukt	AS	"tag"	MW berechnet (apparent)
VT	858-1052	His, FLAG (N-terminal)	25,5 (~30)
MVT	858-1052	His, FLAG (N-terminal)	32,6 (~40)
PTB	gesamt	His, FLAG (N-terminal)	55

Neben den rekombinanten (Meta)Vinculin-Schwanzdomänen kam auch aus Putenmagen über FPLC aufgereinigtes α -Actinin für einige Versuche zum Einsatz (zur Verfügung gestellt von Sebastian Hannemann).

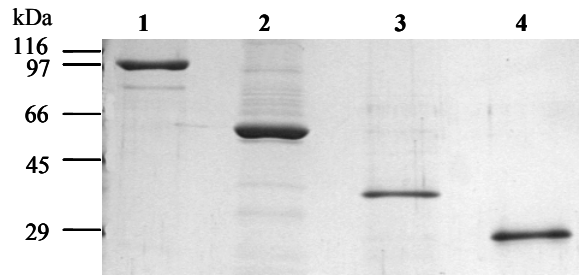


Abbildung 8: Gelelektrophoretische Auftrennung aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten oder bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine

Die Zahlenangaben am oberen Rand der Abbildung verweisen auf die folgenden Proteine: 1= α -Actinin, 2= PTB, 3= MVT, 4= VT

2.2.2.6 Umpuffern von Proteinen

Um die aufgereinigten Proteine in die für die folgende Experimente erforderlichen Puffersysteme zu überführen, wurden die im folgenden dargestellten Methoden eingesetzt.

2.2.2.6.1 Umpuffern von Proteinen mittels Gelfiltration: PD10-Säulen

Über eine PD10-Säule (Pharmacia) lassen sich Volumina von bis zu 2,5 ml umpuffern. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 ml des Zielpuffers äquilibriert. Im Anschluss konnte ein Gesamtvolumen von 2,5 ml Probe aufgetragen werden. War das Probenvolumen geringer, wurde mit Zielpuffer auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml Zielpuffer.

2.2.2.6.2 Umpuffern kleinerer Volumina über Nitrocellulosemembranen

Kleinere Volumina wurden über kleine runde Nitrocellulosemembranen (Millipore) umpuffert. Dazu wurden diese vorsichtig auf die Oberfläche des auf 4°C vorgekühlten Zielpuffers (500-1000 ml) gesetzt. Auf jede Membran wurden bis zu 30 μ l der umzupuffernden Proteinlösung pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubation bei 4°C wurde die Proteinlösung vorsichtig von den schwimmenden Membranen abgezogen und die Konzentration bestimmt.

2.2.2.6.3 Umpuffern von Probenvolumina bis 500 μ l – Eppidialyse

Probenvolumina unter 500 μ l wurden soweit möglich mittels Eppidialyse umpuffert. Hierzu wurde die Proteinlösung in Eppendorfgefäße überführt, deren Deckel kreisförmig ausgeschnitten waren. Die

so entstandene Deckelöffnung wurde durch das vorsichtige Einspannen eines zuvor in Puffer äquilibrierten Dialyseschlauches verschlossen und das Gefäß kopfüber (luftblasenfrei) in den jeweiligen Zielpuffer eingebracht und über Nacht bei 4°C dialysiert.

2.2.2.7 Ankonzentrieren von Proteinen

Um die Konzentration von Proteinen in Lösung zu erhöhen, wurde die relativ schnelle und einfache Methode der Zentrifugation der Proteinlösung in Röhrchen mit integriertem Filter (Millipore) angewandt. Hierbei wurde die Ausschlussgrenze der Filter dem anzukonzentrierenden Protein angepasst. Bei Zentrifugation mit 5000 g kommt es zur Ansammlung des Konzentrats oberhalb des Filters. Eine 10 ml Ausgangslösung wurde je nach Protein und gewünschter Endkonzentration auf 1-5 ml ankonzentriert.

2.2.2.8 Gelfiltrationsanalysen

Die Gelfiltration ist eine der einfachsten und mildesten Chromatographie-Methoden, um Proteine bzw. Proteinkomplexe aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen zu trennen.

Die Gelfiltration wurde unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Ein C2C12-Zellextrakt wurde auf eine „Superdex 200™ prep grade“-Säule (Pharmacia) aufgetragen und bei einer Flussgeschwindigkeit von 2ml/min mit PBS eluiert. Es wurden Fraktionen mit einer Fraktionsgröße von 2 ml aufgefangen und im Western-Blot analysiert.

Herstellung des C2C12-Zellextraktes:

C2C12-Zellen wurde mit PBS gewaschen, mit einem Zellscraper von der Platte gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit Proteaseinhibitoren versetzt (siehe Kapitel 2.2.2.5.3). Nach einer Zentrifugation (1 min, 1000 g, 4°C) wurde der Überstand bis auf 2 ml abgenommen, die Zellen resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung (2 min, 80 W) aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation (12000 x g, 45 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde filtriert (Cellulose Acetat Filter, Porengröße 0,2 µM, Sartorius) und auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

PBS:

- 136 mM NaCl*
- 3 mM KCl*
- 8 mM NaH₂PO₄*
- 1,5 mM KH₂PO₄*
- pH 7,3*

2.2.2.9.2 „Low speed“-Kosedimentation

Die „low speed“- Kosedimentation unterscheidet sich, wie der Name bereits sagt, in der Zentrifugationsgeschwindigkeit von der „high speed“- Kosedimentation. Die Zentrifugation wird hier statt mit 100000 x g lediglich mit 12000 x g durchgeführt, wobei nur durch Aktin-assoziierte Proteine stark gebündelte Filamente schon bei 12000 x g (low speed) sedimentiert werden.

Die Durchführung erfolgte ähnlich der „high speed“- Kosedimentation. Die Reaktionsansätze wurden jedoch nur für 15 min in Eppendorfreaktionsgefäßen zentrifugiert.

2.2.2.10 Bündelungsassays mit TRITC-markiertem Phalloidin

Mit Hilfe des Bündelungsassays kann der Einfluss einzelner Fusionsproteine auf die F-Aktinstruktur fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Durchführung siehe Hüttelmaier et al., 1999)

G-Aktin (3 μ M) und Fusionsproteine wurden in diversen molaren Verhältnissen vermischt und mit F-Aktinpuffer auf ein Endvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Nachdem die Ansätze gut durchgemischt waren, wurden sie 2 h bei 37°C inkubiert. TRITC-markierte Phalloidin-Stammlösung (0,1 mg/ml in Methanol) wurde im Verhältnis 1:10 zugegeben und erneut 1 h bei 37°C inkubiert. Hiernach konnten die Ansätze kurzfristig bei 4°C gelagert oder direkt analysiert werden. Zum Mikroskopieren wurde ein kleiner Tropfen (ca. 1,5 μ l) auf einen Objektträger gegeben. Ein rundes Deckgläschen wurde aufgelegt und die Proben konnten direkt in Lösung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden.

2.2.2.11 Proteinfällung mittels TCA

Proteine können durch Säure-denaturierende Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt werden. Dazu wurde die Proteinlösung mit TCA zu einer Endkonzentration von 15% versetzt und 1 h auf Eis bzw. bei 4°C über Nacht inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 15 min bei 13000 x g sedimentiert und getrocknet. Das getrocknete Sediment wurde in SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.2.2.2) resuspendiert.

2.2.2.12 Chemische Vernetzung („chemical crosslink“)

Der „chemical crosslink“ ist eine Methode, mit deren Hilfe enge Assoziationen von Proteinen durch Zugabe eines „crosslinkers“ stabilisiert werden können. Die stabilisierten Proteinkomplexe können anschließend per SDS-PAGE und Western-Blot untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Bindung von rekombinanten Raver1 bzw. rekombinanten Raver1-Deletionskonstrukten an die Liganden MVT, VT, α -Actinin, PTB und Aktin zu untersuchen.

Hierzu wurden 25-100 pmol der zu testenden Proteine in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 15-45 min bei RT oder 37°C vorinkubiert. Hierbei wurde in „crosslinks“ mit ECP-Aktin-„Crosslink“-Puffer, sonst Standard-Phosphatpuffer verwendet. Anschließend wurden zur Quervernetzung 7,5 µl eines NHS/EDC-Gemisches (100 µl Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuciimid) mit 22 mg/ml und 25 µl EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethyl-Aminopropyl)-Carboiimid) mit 19 mg/ml) zugesetzt und, wenn nicht anders angegeben, 15-30 min bei RT oder 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde in beiden Fällen durch Zugabe von 12,5 µl SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.2.2.2) beendet. Die Analyse der Proben erfolgte im Western-Blot.

Standard-Phosphatpuffer: 50 mM NaP, pH 7,2
 0,2 mM EGTA
 Proteaseinhibitoren (1:500)

ECP-Aktin-„Crosslink“-puffer: 10 mM NaP, pH 7,0
 20 mM NaCl
 50 mM KCL
 0,2 mM CaCl₂
 0,2 mM ATP
 0,1 mM DTT

2.2.2.13 „Magnetic Bead Pulldown“

Der Pulldown mit „Ni-NTA magnetic agarose beads“ wurde durchgeführt, um die Interaktion von rekombinantem His-Raver1-Protein mit Aktin unter polymerisierenden Bedingungen zu untersuchen. Es wurden 75 pmol Raver1 und 75 pmol Aktin in einem Gesamtvolumen von 150 µl F-Aktin-Puffer (siehe Kapitel 2.2.2.9) zusammengegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 15 µl „Ni-NTA magnetic agarose beads“, an welche das rekombinante Raver1-Protein über den His-tag bindet, hinzugegeben und 1 h bei RT im Drehrad inkubiert. Die „Ni-NTA magnetic agarose beads“ konnten mittels Magneten sedimentiert werden. Der Überstand wurde einer TCA-Fällung (siehe Kapitel 2.2.2.11) unterzogen, das Pellet wurde dreimal mit F-Aktin-Puffer gewaschen. Um die Stringenz zu erhöhen, wurde der F-Aktin-Puffer mit 20 mM Imidazol versetzt. Sowohl Pellet als auch Überstand wurden in 15 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und im SDS-Gel analysiert.

2.2.2.14 Ko-Immunpräzipitation

Zur Analyse intermolekularer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen können Proteinkomplexe aus Zellen mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert werden. Potentielle

Liganden des präzipitierten Proteins können im anschließenden Western-Blot (Kapitel 2.2.2.3) spezifisch nachgewiesen und als Komponente dieses zellulären Proteinkomplexes identifiziert werden. HeLaX1/5-Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen ausgesät, nach 24 transfiziert (Kapitel 2.2.3.2) und weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min mit dem bivalenten, membranpermeablen und reduzierbaren „crosslinker“ Dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP; 0,5 mM in PBS) bei 37°C inkubiert. Der „crosslinker“ wurde durch Waschen mit PBS entfernt und freie aktive Gruppen durch 15-minütige Inkubation mit 200 mM Glycin in PBS abgesättigt. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml RIPA-Puffer auf einer Wippe bei 4°C permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem „cellscraper“ abgekratzt, durch Ultraschallbehandlung (2 min, 80 W) vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 4°C sedimentiert (13000 x g, 10 min). Um unspezifische Bindungen an die Sepharose zu verhindern wurde der Überstand mit 15 µl einer 1:1 Suspension Protein- G-Sepharose in Blockpuffer (2% BSA in PBS) versetzt, für 1 h unter Drehen bei 4°C inkubiert und die Sepharose bei 8000 x g sedimentiert. Für die Immunpräzipitation wurde der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Zur Ausbildung sedimentierbarer Antikörperkomplexe wurden 40 µl der Protein-G-Sepharose Suspension zugegeben und für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze fünfmal mit RIPA-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen und zur Spaltung des „crosslinkers“ 10 min in SDS-Probenpuffer bei 100°C aufgekocht und durch SDS-PAGE und Immunblot analysiert.

2.2.2.15 DNaseI-Pulldown

DNaseI wurde mit einer Konzentration von 1 mg/ml kovalent an CNBR-aktivierte Sepharose „beads“ gebunden. Parallel wurden BSA-Sepharose „beads“, welche als negativ Kontrolle dienten, vorbereitet. Die Kopplungseffizienz wurde mittels UV-Spektrometer bestimmt. Undifferenzierte C2C12-Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem „cellscraper“ abgekratzt und in modifiziertes PBS aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer wurden bei 4°C sedimentiert (13000 x g, 10 min). Der Zellextrakt wurde mit DNaseI-„beads“ oder mit BSA-„beads“ versetzt und 1 h bei 4°C rotiert. Die „beads“ wurden im Anschluss viermal mit PBS gewaschen, mit SDS-Probenpuffer bei 100°C aufgekocht und durch SDS-PAGE und Immunblot analysiert.

PBS modifiziert:

PBS mit:

1% NP-40

0,1% DOC

1mM DTT

Proteaseinhibitoren (1:500) **Protein-Lipid-Overlay-Assay/ „PIP-Strip™“**

PIP-Strip™-Membranen (Molecular Probes) wurden eingesetzt, um die Bindung rekombinanter Proteine an Phosphoinositide zu untersuchen.

Die Lipid-Membranen wurden zunächst 1 h bei RT mit TBST+3% BSA inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und anschließend mit 0,5 µg/ml des zu testenden Proteins für 2,5 h bei RT überschichtet. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit TBST+3% BSA gewaschen und erneut mit dem zu testenden Protein inkubiert. Gebundenes Protein konnte mittels FLAG-Erstantikörper und Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper detektiert werden.

2.2.2.17 „Far Western“-Dot-Overlay

Protein-Protein-Interaktionen wurden mittels „Far-Western“-Dot-Overlays analysiert. Steigende Mengen (0,4; 0,8; 1,6; 3,2 und 6,4 pmol) rekombinantes Protein wurden auf eine Nitrocellulosemembran z.T. mit vorheriger Inkubation mit einem 10fachen molaren Überschuss an PIP₂ immobilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit TBST mit 5% Milchpulver abgesättigt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 3 µg/ml rekombinantem Raver1. Gebundenes Protein wurde mittels monoclonalem Raver1-spezifischem Antikörper (5G6) und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen.

2.2.2.18 „Dot Overlay“-Assays

Intermolekulare Protein-Protein Wechselwirkungen können im „Dot Overlay“ nachgewiesen werden. 10-25 pmol einer Proteinlösung wurden mittels Vakuum-Spotters (Biometra) auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht, der Transfer durch Ponceaurot-Färbung überprüft und freie Bindungsstellen der Membran mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST bei RT für 1 h abgesättigt. Nach Waschen mit PBS wurde die Membran mit 20 µl *in vitro* translatierten, radioaktivem Protein in 2 ml TBST mit 14 mM β-Mercaptoethanol für 3 h bei RT inkubiert. Nach intensivem Waschen mit TBST wurde die Membran getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

2.2.2.19 Phosphorylierungsassays

Die Proteine wurde *in vitro* mit der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase (PKA) bzw. der Proteinkinase Cα (PKCα) phosphoryliert, anschließend im 10% SDS-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel.2.2.2.2) und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe Kapitel 2.2.2.3). Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie.

2.2.2.19.1 PKA-Phosphorylierung

10 pmol Protein wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl PKA-Phosphorylierungspuffer bei 30°C inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von 0,5 µM der katalytischen Untereinheit der PKA gestartet und zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 5 µl SDS-Probenpuffer gestoppt.

PKA-Phosphorylierungspuffer 10 mM Hepes (pH 7,5)

50 mM KCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

0,2 mM EGTA

200 µM ATP

0,2 µCi [³²P]-γ-ATP

2.2.2.19.2 PKCα-Phosphorylierung

25 pmol Fusionsprotein wurden in einem Gesamtvolumen von 8 µl PKCα-Phosphorylierungspuffer aufgenommen, mit 1 µl PIP₂ (0,5mg/ml) versetzt und 30 min bei 4°C vorinkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 10 µl Lipid-Mix [100 µl Phosphatidylserin (0,1mg/ml) mit 12-O-Tetradecanolyphorbol-13-acetat/TPA (0,5 µM)] versetzt. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 6 µl ATP-Kinase-Mix [0,25 µl ATP (10 nM), 1 µl CaCl₂ (1 M, 1:64 verdünnt), 1 µCi ³²γ-ATP und 0,3 µl PKCα (0,1 µg/µl), mit Kinasepuffer auf ein Endvolumen von 6 µl) aufgefüllt]. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert und zum gewählten Zeitpunkt durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt.

PKCα-Phosphorylierungspuffer: 20 mM Hepes, pH 7,4

50 mM KCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

0,2 mM EGTA

Proteaseinhibitoren

2.2.2.19.3 Quantifizierung des radioaktiven Einbaus

Um den Grad der Phosphorylierung der rekombinanten Proteine über den Einbau von [³²P]-Phosphat zu bestimmen, wurden Proteine im SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.2.2.2.), auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Kapitel 2.2.2.3) und die Ponceau-gefärbten Proteinbanden

ausgeschnitten. Die enthaltene Radioaktivität wurde durch eine Cerenkov-Zählung in einem Szintillationszähler gemessen. Die Berechnung des radioaktiven Einbaus erfolgte wie in der Dissertation von B. Walders-Harbeck beschrieben.

2.2.2.20 Herstellung von Gewebeextrakten

Die zu untersuchenden Gewebe wurden den Tieren entnommen und in PBS von Bindegewebe, Blut und Fett befreit. Anschließend wurden die gesäuberten Gewebe schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Gewebe wurden mit vorgekühlten Mörsern rasch so fein wie möglich zermörsert. Je 1 g Gewebe wurde in 2 ml RIPA-Puffer aufgenommen. Die Gewebeproben wurden 15 min aufgekocht und für 10 min bei 13000 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit jeweils ¼ Volumeneinheiten SDS-Probenpuffer versetzt und auf SDS-Gele aufgetragen.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris/Cl, pH 7,5
 150 mM NaCl
 1 % Triton-X-100
 0,25 % Desoxycholat
 1-2 mM EGTA

2.2.2.21 Das „Yeast Two-Hybrid“ System

Das „Yeast Two-Hybrid“ System ist eine relativ einfache Methode, *in vivo* bekannte Protein-Protein-Interaktionen näher zu charakterisieren, bzw. neue Liganden eines Proteins in einer Genbank zu identifizieren („screening“). Das Prinzip des Assays basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei voneinander trennbaren Domänen bestehen: einer DNA-bindenden- und einer transkriptionsaktivierenden Domäne. Werden beide Domänen in einer Zelle getrennt exprimiert, erfolgt keine Genaktivierung, da sie nicht direkt miteinander interagieren. Gelangen beide Domänen in der Zelle wieder in enge räumliche Nähe, wird die Funktionalität des Transkriptionsfaktors rekonstituiert. Dies kann über die Expression bestimmter Reportergene nachgewiesen werden.

Bei dem eingesetzten „Matchmaker Two-Hybrid System 3“ (Clontech) werden durch den Einsatz der Vektoren pGAD-T7 (Aktivierungsdomäne) und pGBK-T7 (DNA-Bindungsdomäne) die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 als Fusionsproteine mit den zu untersuchenden Proteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Treten Interaktionen zwischen beiden Proteinen auf, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 rekonstituiert und somit eine Expression von Reportergenen ermöglicht. Als Reportergene dienten einerseits Wachstumsmarker, die es den Hefen bei Interaktion beider Proteine ermöglichen, auf den entsprechend aminosäurefreien Nährmedien zu wachsen. Andererseits wurden Interaktionen über die Aktivierung des Reportergens β -Galactosidase

nachgewiesen. Hefekolonien mit Y2H-Protein-Protein-Interaktionen zeigen im β -Galactosidase-Filterassay unter Einsatz von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactosid) eine blaue Färbung. Die Durchführung der Versuche (Transformation, Selektion, Medienzusammensetzung, β -Galactosidase-Assays) erfolgte analog den Angaben des „Matchmaker Two-Hybrid System“-Protokolls (Clontech, Heidelberg).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf 10 cm Schalen in DMEM-Medium (siehe Kapitel 2.1.7.3) mit entsprechenden Zusätzen bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator. Zur Passage wurden die adhärennten Zellen nach Waschen mit warmem 1 x PBS mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis ein Großteil der Zellen vom Gefäßboden abgelöst war. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen 1:5 bis 1:20 in serumhaltigen Medium verdünnt und erneut ausgesät.

Zur Kultivierung auf Deckgläschen mussten diese zuvor gelatinisiert werden. Dazu wurden sterile eckige Deckgläschen (22x22 mm) in 6-Loch-Schalen, bzw. runde Deckgläschen (Ø 12 mm) in 24-Loch-Schalen platziert und 2 mit Gelatine (2% in PBS) überschichtet. Die Gelatine wurde abgesaugt und die Deckgläschen unter UV-Licht getrocknet, bis sie einen milchigen Schleier aufwiesen. Anschließend konnten die Zellen ausgesät werden.

2.2.3.2 Transfektion von Zellen

2.2.3.2.1 Kalziumphosphat-Methode

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte mittels Kalziumphosphatpräzipitation. Die Methode basiert darauf, dass Fremd-DNA, die an Kalziumphosphatkristalle angelagert ist, unter geeigneten Pufferbedingungen von tierischen Zellen phagozytiert wird. Transfizierte Gene, die in Form von Vektor-DNA in den Kern gelangen, können dort transkribiert und somit exprimiert werden. Auf diese Weise wurde die Lokalisation von Proteinen, bzw. Proteinfragmenten in der Zelle untersucht.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. Sollten die Zellen später durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden, wurden sie auf Deckgläschen kultiviert. Vier Stunden vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Für die Transfektion wurden 1/10 Volumen des Kulturmediums als Transfektionslösung mit 1 µg DNA/ml Kulturmedium versetzt. Für die Transfektion einer 35 mm Schale (2 ml Kulturmedium) wurden somit

2 µg DNA in 200 µl Transfektionslösung verwendet. Dazu wurden 2 µg der gewünschten Plasmid-DNA mit sterilem MQ-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 90 µl eingestellt, tropfenweise mit 10 µl 20 x CaCl₂ versetzt und gevortext. Die DNA/CaCl₂-Lösung wurde langsam unter ständigem Vortexen in ein 15 ml Röhrchen mit 100 µl 2 x HEBS eingetropft, wobei die DNA zusammen mit dem Kalziumphosphat ausfällt und einen milchigweißen Niederschlag bildet. Das vollständige Ausfällen benötigte 30-60 min bei RT. Anschließend wurden die Präzipitate auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und 16 h später durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach weiteren 24-48 h konnte die Expression des transfizierten Gens untersucht werden.

2.2.3.2.2 Transfektion mit FuGene™ Transfektionsreagenz

Fugene™ Transfektionsreagenz ist ein nicht liposomaler Lipidmix, der eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht. Für einige Versuche, wie Immunpräzipitationen, für die eine hohe Transfektionsrate erforderlich war, wurden zum Teil dieses Agens verwendet. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. 1 µg der gewünschten Plasmid-DNA wurden mit 100 µl serumfreien DMEM und 5 µl FuGene™ Transfektionsreagenz für 20-30 min inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für weitere 24-48 h inkubiert und anschließend auf die Expression des transfizierten Gens untersucht.

2.2.3.3 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Für Immunfluoreszenzstudien mussten die Zellen vor der Antikörperinkubation fixiert und permeabilisiert werden. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen wurde das Medium durch dreimaliges waschen mit PBS entfernt. Die Fixierung erfolgte bei RT durch 20-minütige Inkubation mit 3,7% Formaldehyd in PBS. Anschließend wurde die Fixierlösung durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 0,2% Triton-X-100 in PBS 15 min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte mit der Inkubation der Antikörper begonnen werden.

2.2.3.4 Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode lassen sich strukturelbundene Proteine in Zellpräparaten spezifisch und mit hoher Auflösung darstellen.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Aktin-Cytoskeletts und assoziierter Strukturen wurden fixierte permeabilisierte Zellen mit 1% BSA überschichtet und anschließend in einer feuchten Kammer mit 20 µl des entsprechenden Antikörper, in geeigneter Verdünnung 30-60 min bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen erneut

mit 1% BSA in PBS überschichtet. Anschließend wurde mit 20 µl eines Fluorescein-, bzw. Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, 30-60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Zur Darstellung von Aktinfilamenten mittels direkter Fluoreszenz wurde Fluorescein-, bzw. Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin, ein Stoffwechselprodukt des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das hochspezifisch an Aktinfilamente bindet, verwendet. Dazu wurden die Zellen in einer direkten Fluoreszenz mit einer 10 µM Phalloidin-FITC, bzw. -TRITC Lösung inkubiert, wie bereits für die Antikörper beschrieben.

Für Kolokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt, indem Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet wurden, die anschließend von Rhodamin-, bzw. Fluorescein-gekoppelten Antikörpern erkannt wurden.

Zur Einbettung der Fluoreszenzpräparate wurden die Deckgläschen nach den Inkubationen dreimal mit PBS gewaschen und kurz in H₂O geschwenkt. Mowiol + Bleichschutz (3+1) wurde auf einen Objektträger aufgetropft und die Präparate mit den Zellen nach unten eingebettet. Die Präparate wurden 24 h bei RT getrocknet und unter Verwendung geeigneter Filtersätze für Rhodamin und Fluorescein-Färbungen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Dokumentation wurden mit einer CCD-Kamera Bilder aufgenommen, die Verarbeitung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Myofibrillen

Myofibrillen wurden aus frisch präpariertem Muskelgewebe isoliert und 30 min unter Rühren in einem 40fachen Volumen Ringerlösung auf Eis inkubiert. Das Gewebe wurde anschließend in Rigorlösung überführt (pro 0,5 g Gewebe wurden 5 ml Lösung zugesetzt) und mit einem Dounce Homogenisator homogenisiert. Das so zerkleinerte Gewebe wurde erneut unter Rühren 10 min auf Eis inkubiert, nachfolgend bei 7000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in einem 10fachen Volumen Rigorlösung aufgenommen. Die Schritte Homogenisation und Zentrifugation wurden dreimal wiederholt. Die so isolierten Fibrillen wurden in einer 2-fach Rigorlösung mit 50% Glycerin aufgenommen und bei -20°C gelagert.

<i>Ringerlösung:</i>	<i>100 mM NaCl</i>	<i>Rigorlösung:</i>	<i>100 mM KCl</i>
	<i>2 mM MgCl₂</i>		<i>2 mM MgCl₂</i>
	<i>5 mM EGTA</i>		<i>2 mM EGTA</i>
	<i>10 mM NaH₂PO₄</i>		<i>0,3 mM DTT</i>
	<i>0,1% Glucose</i>		<i>pH 7</i>
	<i>pH 7,4</i>		

2.2.4.2 Färbung von Myofibrillen

Etwa 15 µl der myofibrillenhaltigen Lösung wurden auf Objektträger aufgetragen und für etwa 10 min ohne Erschütterung inkubiert. Für die Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Fibrillen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd überschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Myofibrillen für 2 h mit 5% BSA in PBS abgesättigt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Schnitte mit dem PBS verdünnten Erstantikörper, bzw. des unverdünnten Zellkulturüberstandes. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und die Schnitte für 45 min mit dem ebenfalls in PBS verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Myofibrillen in Mowiol eingebettet und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die so behandelten Myofibrillen wurden am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

2.2.4.3 Herstellung von Gefrierschnitten

Die den Mäusen entnommenen Organe wurden sofort in kaltem PBS von Bindegewebe, Blut und Fett befreit, abgetropft und mit „Polyfreeze tissue freezing medium™“ auf einem Eiweißblock aufgeklebt, der wiederum auf einer Korkscheibe befestigt wurde. Zusätzlich wurden die Gewebe mit Minutien fixiert, um ein Zusammenziehen zu verhindern. Eingefroren wurden die Blöcke in mittels flüssigen Stickstoffs gekühltem Polyethylenglycol. Von den gefrorenen Blöcken wurde mit Hilfe eines Cryotoms je nach Gewebe 5-20 µm dicke Schnitte angefertigt.

2.2.4.4 Färbung von Gefrierschnitten

Die Schnitte wurden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Für die Fixierung wurden die Schnitte zunächst kurz (15-20 s) mit 1% Triton-X-100 in PBS extrahiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritte und eine Extraktion für 30 min mit 0,2% Triton-X-100 in PBS bei Raumtemperatur. Die fixierten Schnitte wurden für 1 h mit α -Maus-IgG-Fab-Fragmenten abgesättigt und für 1 h mit dem in PBS verdünnten Erstantikörper bzw. unverdünnten Zellkulturüberstand inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit PBS entfernt und die Schnitte wurden für 45 min mit dem ebenfalls in PBS verdünnten Zweitantikörper und z.T. mit Phalloidin-FITC inkubiert. Um Zellkerne anzufärben wurde im Anschluss eine DAPI-Färbung für 5 min bei 37°C durchgeführt und die Schnitte dann mit Mowiol eingebettet und über Nacht bei RT getrocknet. Die so behandelten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische Untersuchungen zur Wechselwirkung rekombinanter Raver1-Proteine mit verschiedenen Liganden

Die Interaktion von Raver1 mit Vinculin, Metavinculin, α -Actinin und PTB wurde in „Yeast Two-Hybrid“-Analysen, Overlay- und Immunpräzipitations-Experimenten gezeigt (Hüttelmaier et al., 2001). Diese bisher durchgeführten Untersuchungen können eine direkte Interaktion der Proteine mit Raver1 nicht eindeutig beweisen. Sowohl in Overlay-Experimenten mit *in vitro* translatiertem Raver1-Protein als auch in Immunpräzipitationsversuchen könnten die Proteine indirekt interagieren, zumal alle Raver1-Liganden in Multiproteinkomplexen vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher Raver1 und die Wechselwirkung des Proteins mit den bekannten Bindungspartnern biochemisch analysiert werden. Zudem sollte die Identifizierung neuer Raver1-Liganden und die anschließenden Charakterisierung dieser Wechselwirkungen weiteren Aufschluss über die Funktion von Raver1 geben. Zur Identifizierung der Raver1-Proteine wurden verschiedene monoklonale Antikörper eingesetzt, die in Kapitel 3.4.1 beschrieben sind.

3.1.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Raver1-Proteine

Um Raver1-Protein für biochemische Studien aufreinigen zu können, musste zunächst die Expression etabliert und optimiert werden. In einem ersten Ansatz wurde das Protein in prokaryotische Expressionsvektoren (Tabelle 5) kloniert. Bei Verwendung dieser Vektoren in prokaryotischen Zellen (*E.coli*; Tabelle 5) entstehen Proteine, die mit einem Fusionsanteil versehen sind, bei dem es sich entweder um den sogenannten His-„tag“, bestehend aus 6 N-terminalen Histidinen, oder um das „maltose binding protein“ handelt. Diese Fusionsanteile ermöglichen die spezifische Aufreinigung der Proteine. Ein für die Testexpression eingesetztes Konstrukt (Raver1 in pMAL C2) wurde freundlicherweise von S. Hüttelmaier zur Verfügung gestellt.

Zunächst sollte die Eignung unterschiedlicher *E.coli*-Stämme in Kombination mit unterschiedlichen Expressionsvektoren zur Herstellung von rekombinantem Raver1-Protein überprüft werden. Die einzelnen *E.coli*-Stämme sind alle Derivate des *E.coli*-Stamms BL21, weisen jedoch unterschiedliche Eigenschaften bezüglich der „codon usage“, des Expressionslevels und der Ausbildung von Disulfidbrücken im exprimierten Protein auf. Es wurden Expressionskinetiken (wie in Kapitel 2.2.2.5.1 beschrieben) bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Abbildung 9 zeigt exemplarisch für sämtliche durchgeführten Analysen die Expression von rekombinantem Raver1 im Vektor pET28a in den *E.coli*-Stämmen BL21 und BL21-codon-plus bei 25°C und 37°C im Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-Gel und im Western-Blot.

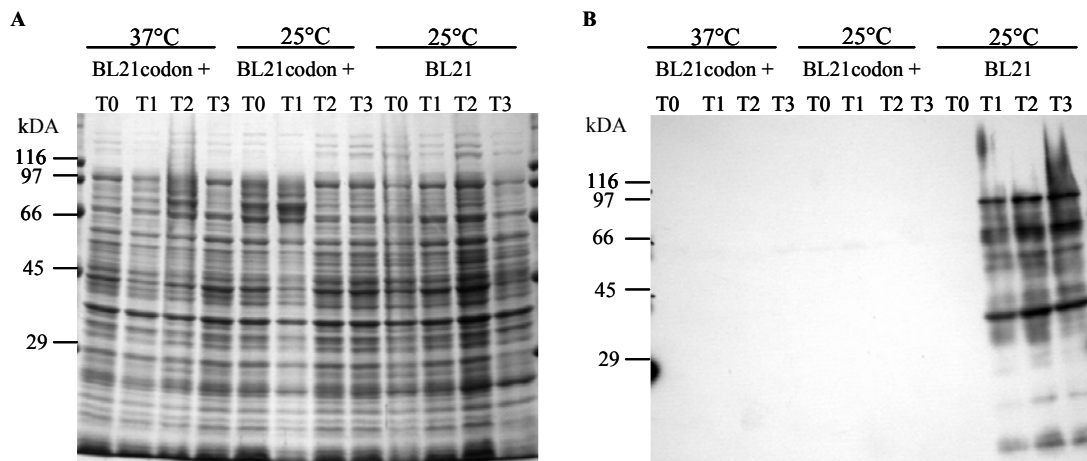


Abbildung 9: Expression eines pET28a-Raver1-Konstrukts in den *E.coli*-Stämmen BL21 und BL21-codon-plus

Zur Expressionskontrolle wurden Proben der transformierten Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und im SDS-Gel aufgetrennt, das im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt wurde (A). Abbildung B zeigt den entsprechenden Western-Blot. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit den Raver1-spezifischen Antikörper 5G6 (siehe Kapitel 2.1.6 und 3.4.1) und einem Peroxidasegekoppelten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper. Im gefärbten SDS-Gel sind keine eindeutigen Induktionsbanden zu erkennen, der Western-Blot zeigt, dass lediglich in den kompetenten BL21 bei 25°C, rekombinantes Raver1-Protein exprimiert wurde, das jedoch stark degradiert war.

T0= vor Induktion

T1= nach 1-stündiger Expression

T2= nach 2-stündiger Expression

T3= nach 3-stündiger Expression

Keines der Konstrukte zeigt im SDS-Gel eine deutliche Induktionsbande bei der erwarteten Höhe von 80 kDa. Im Western-Blot konnte mit spezifischen Antikörpern lediglich für den Stamm BL21 eine Expression nachgewiesen werden, das Produkt wies hierbei jedoch deutliche Degradationsbanden auf. Alle in Tabelle 5 aufgeführten Expressionsanalysen zeigten entweder keine Expression von rekombinantem Raver1-Protein, oder nur eine sehr geringe Expressionsrate mit deutlichem proteolytischen Abbau.

Aus diesen Versuchen musste geschlossen werden, dass prokaryotische Expressionssysteme für die Herstellung rekombinanten Raver1-Proteins ungeeignet waren.

Daher wurde im Folgenden ein eukaryotisches Expressionsverfahren, das Bac-to-Bac®-System, für die Expression und Aufreinigung von rekombinantem Raver1-Protein eingesetzt (Kapitel 2.2.2.5.3). Dieses System ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine mittels rekombinanter Baculoviren in Insektenzellen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der durchgeführten Expressionsanalysen in *E. coli*

Die Tabelle zeigt die durchgeführten Expressionstests. Hierbei wurden die Expressionskonstrukte in Kombination mit unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen bei verschiedenen Temperaturen verwendet.

Konstrukt	<i>E.coli</i> -Stamm	25°C	30°C	37°C	RT
Raver1 pQE30-FLAG	XL1-blue		x	x	
	M15		x	x	
	BL21		x	x	
	BL21-Tuner	x		x	
	BL21-Rosetta	x		x	
	BL21-Origami	x		x	
Raver1 pET28a-His	BL21		x	x	x
	BL21-Tuner		x	x	
	BL21-Rosetta		x	x	
	BL21-Origami		x	x	
	BL21-codon-plus	x	x	x	
Raver1 pET 23	BL21-codon-plus	x		x	
Raver1 pMal C2	BL21			x	
	BL21-Tuner			x	
	BL21-Rosetta			x	
	BL21-Origami			x	
	BL21-codon-plus	x		x	

X: Ein Expressionstest wurde durchgeführt, es wurde jedoch entweder kein Protein exprimiert, oder das rekombinante Raver1-Protein war bereits nach einstündiger Expressionszeit stark degradiert.

3.1.1.1 Aufreinigung rekombinanter Raver1-Proteine aus Insektenzellen

In Zusammenarbeit mit Joop van den Heuvel (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, GBF, Braunschweig) wurden Raver1-Proteine in mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insektenzellen exprimiert und anschließend aufgereinigt. Der Expressionszeitraum musste hierbei für das rekombinante Wildtyp (WT)-Protein mit 24 h relativ kurz gewählt werden, da es auch in diesem System bei längeren Expressionszeiten zu einer starken Degradation des Proteins bereits in den Insektenzellen kam (Daten nicht gezeigt). Die Aufreinigung erfolgte in einem Ein-Schritt- oder „batch“-Verfahren und wurde wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 10 sind ein Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel und der entsprechende Western-Blot einer Raver1-Aufreinigung dargestellt. Spur 1 zeigt die Expression von rekombinantem WT-Raver1-Protein im Gesamtzelllysat. Einige Degradationsbanden sind im Western-Blot zu erkennen. Nach dem Zellaufschluss (Spur 2) wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert; ein Schritt, bei dem auch unlösliches, rekombinantes Protein im Pellet verbleibt (Spur 4). Der Überstand wurde auf Ni-NTA-Agarose gegeben und der Großteil des im Überstand verbliebenen Raver1-Proteins

bindet über den His-„tag“ an den Nickelanteil der Agarose (Spur 5). In den folgenden Waschschrritten (Spur 7-9) wurde nicht gebundenes Protein herausgewaschen, bis der Überstand fast klar erschien. Die Elution der Proteine erfolgte mit 150 mM Histidin (Spur 9-12). Neben der erwarteten Bande bei ca. 80 kDa zeigte das Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gel einige weitere Banden, deren Großteil im Western-Blot als proteolytische Abbaufragmente identifiziert werden konnten. Diese Abbaubanden ließen sich nicht durch Erhöhung der Proteaseinhibitorenkonzentration reduzieren, und ihr Vorhandensein im Insektenzellextrakt deutet bereits auf eine Degradation während der Expression hin. Die Expressionsdauer wurde jedoch nicht weiter verkürzt, um die Gesamtproteinausbeute nicht weiter zu reduzieren. Aus 3×10^8 -Insektenzellen konnte etwa 1 mg Protein aufgereinigt werden.

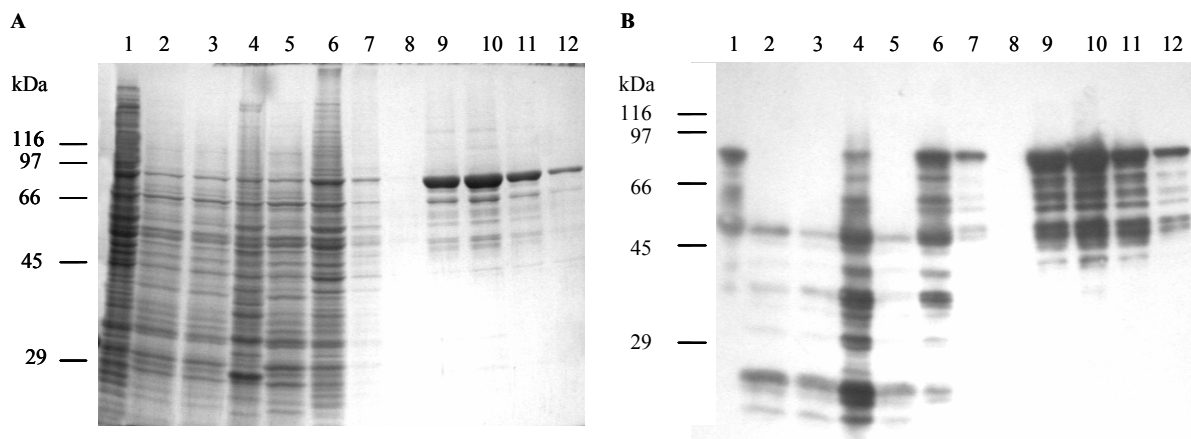


Abbildung 10: Aufreinigung von rekombinantem Raver1-Protein aus Insektenzellen mittels Ni-NTA-Agarose (in Zusammenarbeit mit Joop van den Heuvel, GBF)

Rekombinantes Raver1-Protein lässt sich aus Insektenzellen aufreinigen.

A: Coomassie Brilliant Blue gefärbtes Gel

B: Western-Blot (anti-Raver1 (5G6))

1: Zellen bei der Ernte; 2: Zellaufschluss; 3: Überstand nach erster Zentrifugation; 4: Pellet nach erster Zentrifugation; 5: Überstand nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose; 6: Waschen mit Lysispuffer; 7: Waschen mit Waschpuffer; 8: Waschen mit Elutionspuffer ohne Histidin; 9-12: Elutionsfraktionen (150 mM Histidin)

Neben dem rekombinanten Gesamtprotein wurde mit zwei Raver1-Deletionsfragmenten, Raver1 Δ N und Raver1 Δ C, gearbeitet. Das Konstrukt Raver1 Δ N umfasst mit den Aminosäuren 442-748 den C-terminalen Bereich des Proteins ohne die RRM („RNA recognition motif“), das Konstrukt Raver1 Δ C (AS 1-441) ist zu Raver1 Δ N komplementär (Abb. 11B). Entsprechende Konstrukte wurden bereits in der Erstbeschreibung (Hüttelmaier et al., 2001) in „Yeast Two-Hybrid“-Analysen eingesetzt. Die Deletionsfragmente wurden entsprechend des Protokolls für die Aufreinigung des Gesamtproteins mit guter Proteinausbeute aufgereinigt (3,5 mg aus $1,5 \times 10^8$ Insektenzellen). Da beide Fragmente kaum Degradation zeigten, konnte eine Expressionsdauer von 48 h gewählt werden. Die rekombinanten Raver1-Proteine finden sich mit allen relevanten Angaben in Tabelle 6, ein Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel der verwendeten Raver1-Proteine ist in Abbildung 11 dargestellt.

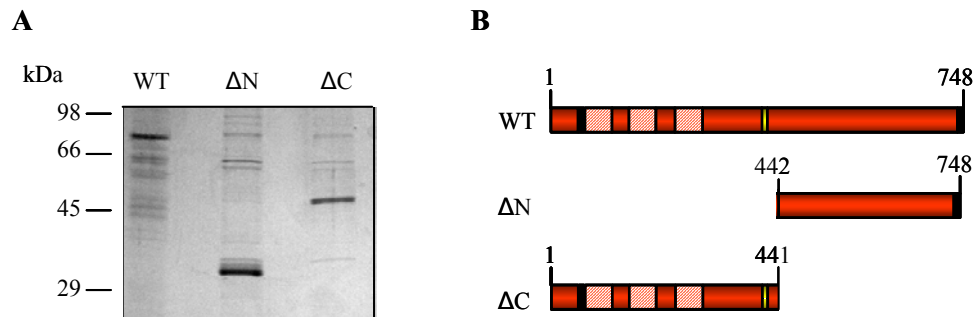


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung und schematische Darstellung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Raver1-Proteine

A: Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel der rekombinanten Raver1-Proteine: Wildtyp (WT), ΔN und ΔC.

B: Schematische Darstellung der verwendeten und in A dargestellten Proteine. Die Polypeptidsequenz ist in rot dargestellt. Drei RNA-Erkennungsmotive (RRM) sind gestreift, eine potentielle Kernexportsequenz (NES) ist in gelb, die Kernlokalisierungssequenzen (NLS) sind in schwarz eingezeichnet.

WT: Raver1(AS 1-748); ΔN: Raver1ΔN (AS 442—748); ΔC: Raver1ΔC (AS 1-441)

Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Raver1-Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurde Gesamt-Raver1 als rekombinantes Protein mit einem His- und einem FLAG-Fusionsanteil aufgereinigt. Daneben wurden der Erstbeschreibung (Hüttelmaier et al., 2001) entsprechende Deletionskonstrukte (Raver1ΔC und Raver1ΔN) durch die Umklonierung in den entsprechenden Expressionsvektor ebenso mit den beiden Fusionsanteilen versehen und konnten aufgereinigt werden.

Konstrukt	AS	"tag"	MW berechnet
Raver1	1-748	His, FLAG (N-terminal)	86
Raver1ΔC	1-441	His, FLAG (N-terminal)	51
Raver1ΔN	442-748	His, FLAG (N-terminal)	35

AS: Aminosäuren; MW: Molekulargewicht

3.1.2 Analyse der direkten Interaktion von Raver1 mit bereits beschriebenen Liganden

Die erfolgreich etablierte Aufreinigung von rekombinantem Raver1-Protein und einiger Deletionskonstrukte ermöglicht es, die direkte Interaktion mit den bisher beschriebenen Bindungspartnern zu überprüfen und die Wechselwirkung mit neuen Bindungspartnern (Kapitel 3.2) biochemisch zu charakterisieren.

3.1.2.1 Interaktion mit Vinculin und Metavinculin

Vinculin und Metavinculin wurden als cytoplasmatische Liganden von Raver1 identifiziert (Hüttelmaier et al., 2001, siehe auch Kapitel 1.2.2.2). Hierbei konnten die Bindungsregionen auf den N-Terminus von Raver1 und die C-terminalen Schwanzregionen beider Adhäsionsproteine eingegrenzt werden. Für die biochemische Analyse der Interaktion konnten daher statt Gesamt-Vinculin und Gesamt-Metavinculin somit die rekombinanten Schwanzdomänen (VT „vinculin tail“ und MVT „metavinculin tail“) beider Proteine eingesetzt werden. Diese ließen sich gut bakteriell exprimieren und über einen His-Fusionsanteil aufreinigen (Kapitel 2.2.2.5.2). Zudem wurden sie mit einem FLAG-Fusionsanteil versehen, um die Detektion mit einem entsprechenden Antikörper zu ermöglichen.

Die Interaktion des rekombinanten Raver1-Proteins mit den rekombinanten Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin wurde mit verschiedenen Ansätzen analysiert. Zunächst wurden „chemical crosslink“-Experimente durchgeführt und die Komplexbildung im Western-Blot mit einem Raver1-Antikörper (5G6), einem Metavinculin-spezifischen Antikörper (6E3) und dem FLAG-Antikörper (Sigma), der sowohl das rekombinante Raver1-Protein als auch MVT und VT erkennt, verfolgt. Da für (M)VT die Bildung von Dimeren und höheren Oligomeren bedingt durch eine Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) induzierte Konformationsänderung beschrieben ist (Hüttelmaier et al., 1998, Witt et al., 2004), wurden die Experimente zusätzlich in Gegenwart von PIP_2 durchgeführt. Die Kombination von Lipid und chemischem „crosslinker“ in den Ansätzen bewirkte teilweise ein verschmiertes Laufverhalten der Proben. Die Ausbildung von Raver1-(M)VT-Heterodimeren in An- und Abwesenheit von PIP_2 wurde zunächst mit dem Raver1-Antikörper 5G6 untersucht (Abb. 12A). Eine Selbstassoziation von Raver1 war sowohl ohne als auch mit PIP_2 im Versuchsansatz nicht zu beobachten, in Gegenwart von MVT und VT, erschienen höhere Banden, die nach ihrem Molekulargewicht Heterodimeren entsprechen könnten. Diese möglichen Heterodimere wurden in Gegenwart von PIP_2 ausgebildet. In Abwesenheit von PIP_2 waren keine potentiellen Raver1-VT-Heterodimere und kaum potentielle Raver1-MVT-Heterodimere nachweisbar. Mit dem Metavinculin-spezifischen Antikörper 6E3 konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um Heterodimere handelt (Abb. 12B). Da ein spezifischer VT-Antikörper nicht zur Verfügung stand, wurde VT mit dem FLAG-

Antikörper, der neben VT-Monomeren, -Dimeren und -Multimeren auch rekombinantes Raver1-Protein erkennt, nachgewiesen (Abb. 12C). In Anwesenheit von PIP_2 erschien im Versuchsansatz mit Raver1 und VT eine zusätzliche Bande, die nicht nachzuweisen war, wenn sich kein Raver1 im Ansatz befand. Bei dieser Bande muss es sich somit um ein Raver1-VT-Heterodimer handeln. PIP_2 induzierte zudem erwartungsgemäß die Ausbildung von VT- und MVT- Dimeren und Oligomeren.

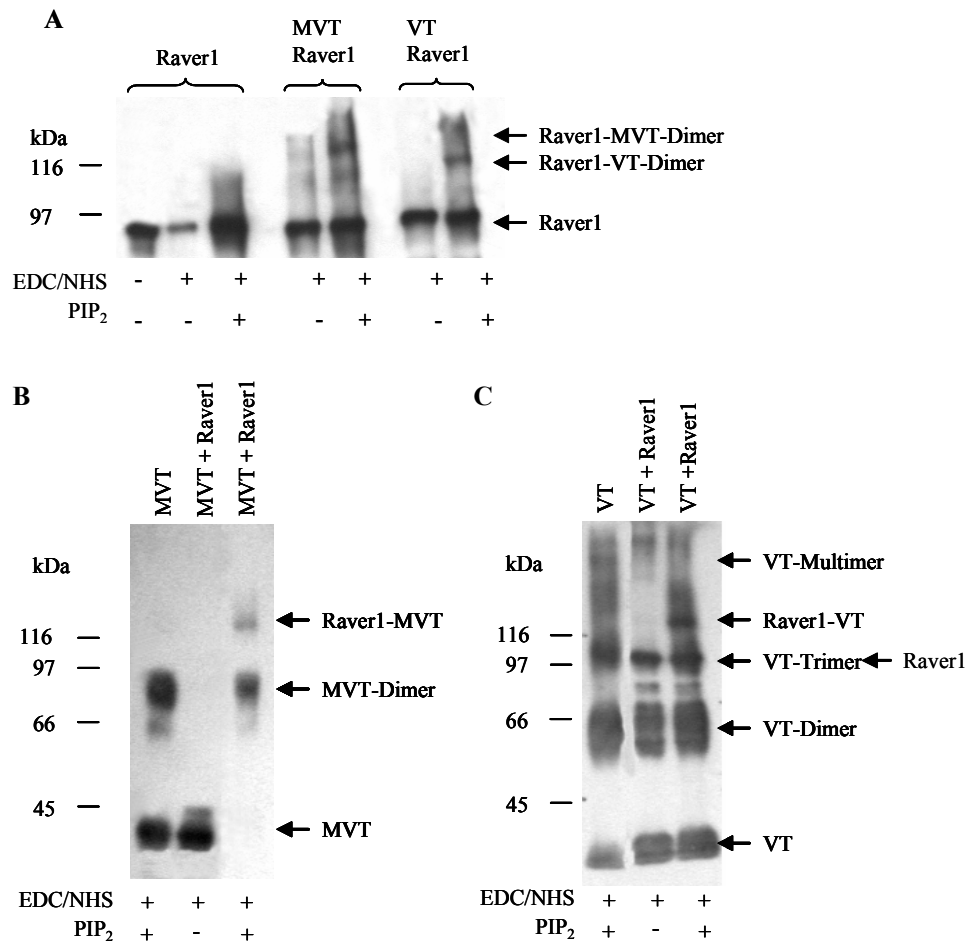


Abbildung 12: Untersuchung der Interaktion von Raver1 mit den Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin

EDC/NHS-„crosslink“ von rekombinantem Raver1 mit rekombinanter MVT und VT in Abwesenheit oder in Gegenwart von PIP_2 (10 μM). (A) Die Assoziation der Proteine wurde im Western-Blot mit anti-Raver1-Antikörper (5G6) verfolgt; (B) zeigt einen mit dem anti-MVT-Antikörper (6E3) entwickelten Western-Blot; in (C) wird die Proteinassoziation mit einem FLAG-Antikörper, der sowohl rekombinantes Raver1-Protein, als auch VT erkennt, analysiert. Raver1 zeigt keine Selbstassoziation und bindet in Gegenwart von PIP_2 an MVT und VT. PIP_2 induziert zudem die Ausbildung von MVT- und VT- Dimeren und Oligomeren.

Die im „chemical-crosslink“ erzielten Ergebnisse konnten im ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) (Kapitel 2.2.2.4) verifiziert werden. Hierbei wurden 50 pmol VT und MVT direkt oder nach vorheriger Inkubation mit PIP_2 an die „wells“ einer Mikrotiterplatte gebunden und mit steigenden Konzentrationen (2 bis 25 pmol) Raver1-Protein überschichtet. Gebundenes Raver1-Protein wurde mittels eines Raver1-Antikörpers und eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers

nachgewiesen; das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne VT oder MVT, ohne rekombinantes Raver1-Protein respektive ohne Antikörper durchgeführt. Rekombinantes Raver1-Protein zeigte eine Bindung an immobilisiertes VT und MVT, wobei höhere Werte für MVT gemessen wurden, was auf eine stärkere Affinität von Raver1 für diese Isoform deutet. Wurden die Schwanzdomänen zuvor mit PIP_2 inkubiert, wurden insgesamt höhere Absorptionswerte erzielt. Dies bestätigt auch die Beobachtungen des „Crosslink“-Experiments (Abb.12), in dem die Ausbildung von VT-Raver1 und MVT-Raver1 Heterodimeren hauptsächlich in Gegenwart von PIP_2 nachgewiesen werden konnte.

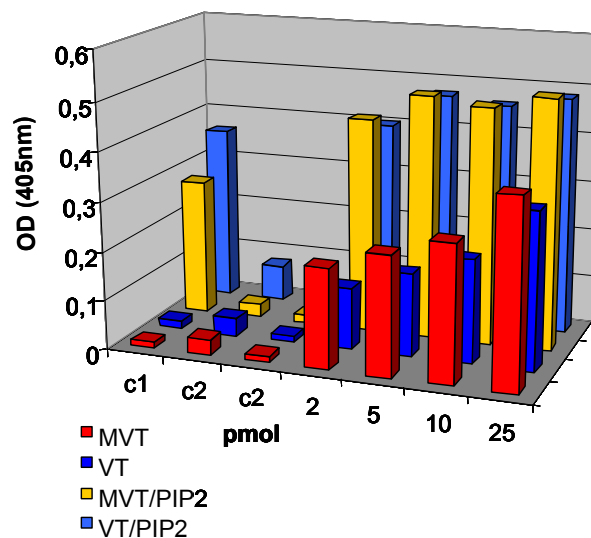


Abbildung 13: Rekombinantes Raver1-Protein bindet im ELISA an die (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne

Rekombinantes Raver1-Protein bindet in steigenden Konzentrationen an die an einer ELISA-Platte immobilisierte MVT und VT und kann mit dem Raver1-spezifischen Antikörper 5G6 nachgewiesen werden. Die Präinkubation von MVT und VT mit PIP_2 verstärkt die Bindung, allerdings bindet rekombinantes Raver1-Protein auch an mit BSA und PIP_2 gekoppelte wells der ELISA-Platte (c1).

c1= Kontrolle mit BSA anstatt (M)VT, c2= Kontrolle ohne Raver1, c3=Kontrolle ohne 1.Antikörper,

Eine Betrachtung der entsprechenden Kontrollen zeigte jedoch auch hier höhere Werte für die lediglich mit BSA und PIP_2 beschichteten „wells“ der Mikrotiterplatte. Da Raver1 eindeutig keine Bindung an BSA zeigte (Abb. 13, c1) war dies ein erster Hinweis darauf, dass Raver1 möglicherweise auch selbst mit sauren Phospholipiden interagieren kann. Diese Möglichkeit wurde ebenfalls untersucht und ist in Kapitel 3.3.1 dargestellt.

Mittels „Yeast Two-Hybrid“-Analysen konnte die Bindung von (Meta)Vinculin an Raver1, auf den N-Terminus von Raver1 eingegrenzt werden (Hüttelmaier et al., 2001). In Anlehnung an diese Befunde wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem Gesamtprotein auch ein N-terminales-Fragment (Raver1 Δ C, AS 1-441) für die biochemische Analyse eingesetzt und dessen Interaktion mit der Vinculin- und Metavinculinschwanzdomäne in „crosslink“- und ELISA-Experimenten untersucht.

Nach „chemical crosslinking“ wurde die Raver1 Δ C-MVT-Assoziation im Western-Blot mit einem Raver1-Antikörper (5G6) und einem Metavinculin-Antikörper (6E3) verfolgt (Abb. 14). Befanden sich sowohl Raver1 Δ C als auch MVT im Versuchsansatz kam es zur Ausbildung von zusätzlichen Komplexen, die nicht zu beobachten waren, wenn sich nur ein Protein im Ansatz befand. Aufgrund des Molekulargewichts und der Nachweisbarkeit der Komplexe mit sowohl dem Raver1-Antikörper 5G6 als auch dem Metavinculin-Antikörper 6E3, konnten diese Komplexe als Raver1-MVT-Heterodimere identifiziert werden. Darüber hinaus scheint eine Selbstassoziation von Raver1 über den N-Terminus möglich, da im Gegensatz zum Wildtyp (WT) auch Raver1 Δ C-Homodimere entstanden.

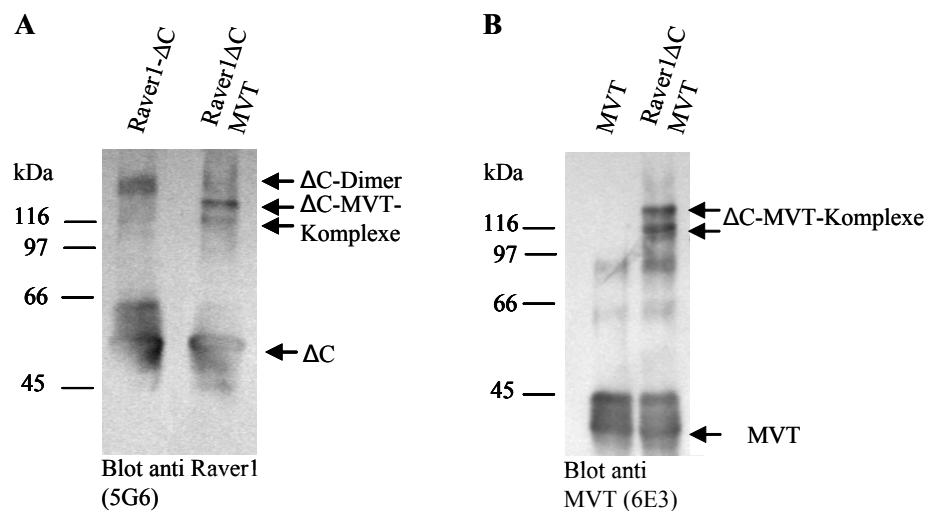


Abbildung 14: Rekombinantes Raver1 Δ C-Protein bindet im „chemical crosslink“ an die Metavinculin-Schwanzdomäne

„Chemical crosslink“ mit Raver1 Δ C und MVT. Die Blots wurden anti-Raver1 (5G6) (A) bzw. anti-MVT (6E3) (B) mit anschließendem, HRP-gekoppeltem Zweitantikörper entwickelt. Raver1 Δ C bildet Homodimere, jedoch auch Komplexe mit MVT.

Raver1 Δ C bildete mit VT keine im Western-Blot nachweisbaren Komplexe aus (nicht gezeigt), daher sollte diese Bindung im sensitiveren ELISA-Experiment überprüft werden (Abb. 15). Nach Kopplung von 25 pmol VT und MVT an eine Mikrotiterplatte wurde diese mit steigenden Konzentrationen Raver1 Δ C (von 2,5 bis 20 pmol) inkubiert. Wie bereits im „crosslink“-Experiment, zeigte Raver1 Δ C eine Bindung an MVT, für VT ließ sich keine eindeutige Bindung zeigen; die Absorptionswerte gingen nur knapp über die Werte der Kontrollen hinaus. Die Bindung von Raver1 Δ C an MVT ist somit wesentlich stärker als die Bindung an VT, oder sie ist stärker von der Konformation des Raver1-Proteins abhängig, die durch die Deletion der Aminosäuren 442-748 modifiziert sein könnte. Diese Beobachtungen stimmen mit „Yeast Two-Hybrid“-Daten überein, die ebenfalls eine stärkere Interaktion von Raver1 mit MVT als mit VT belegen (Hüttelmaier et al., 2001).

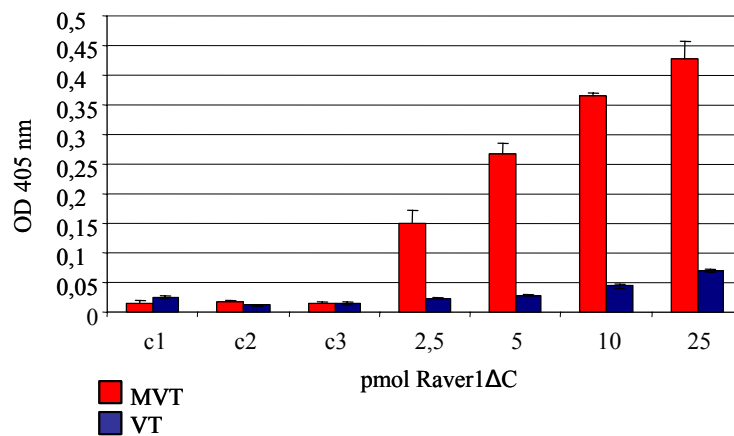


Abbildung 15: Bindung von rekombinantem Raver1ΔC an die (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne

25 pmol VT bzw. MVT wurden an den „wells“ einer ELISA-Platte immobilisiert und mit steigenden Raver1ΔC-Konzentrationen inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper (anti-Raver1 (5G6)) und einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Rekombinantes Raver1ΔC-Protein bindet kaum an VT, jedoch stark an MVT. Die dargestellten Balken zeigen die Mittelwerte aus drei Experimenten mit angegebener Standardabweichung.

c1= Kontrolle ohne (M)VT; c2= Kontrolle ohne Raver1ΔC; c3= Kontrolle ohne ersten Antikörper

3.1.2.2 Interaktion mit α -Actinin

Ebenso wie die Bindung an (M)VT konnte eine Interaktion von Raver1 mit dem cytoplasmatischen Liganden α -Actinin bisher im „Yeast Two-Hybrid“-System, sowie in Immunpräzipitations- und Overlay-Experimenten gezeigt werden (Hüttelmaier et al., 2001). Die biochemische Überprüfung einer direkten Interaktion mit rekombinantem Raver1-Protein erfolgte in dieser Arbeit teilweise analog zur im vorherigen Kapitel dargestellten Analyse der Raver1-(M)VT-Interaktion.

In „chemical-crosslink“-Experimenten, die wie in Kapitel 2.2.2.12 beschrieben durchgeführt wurden, konnte die Bildung von Raver1- α -Actinin- Heterodimeren beobachtet werden (Abb. 16). Diese Heterodimere konnten sowohl mit einem Raver1-Antikörper, wie auch mit einem α -Actinin-Antikörper (Kapitel 2.1.6) nachgewiesen werden. α -Actinin bildete, erwartungsgemäß, in Abwesenheit von Raver1 homomere Komplexe; rekombinantes Raver1-Protein zeigte wie bereits in Abbildung 12 dargestellt, keine Selbstassoziation.

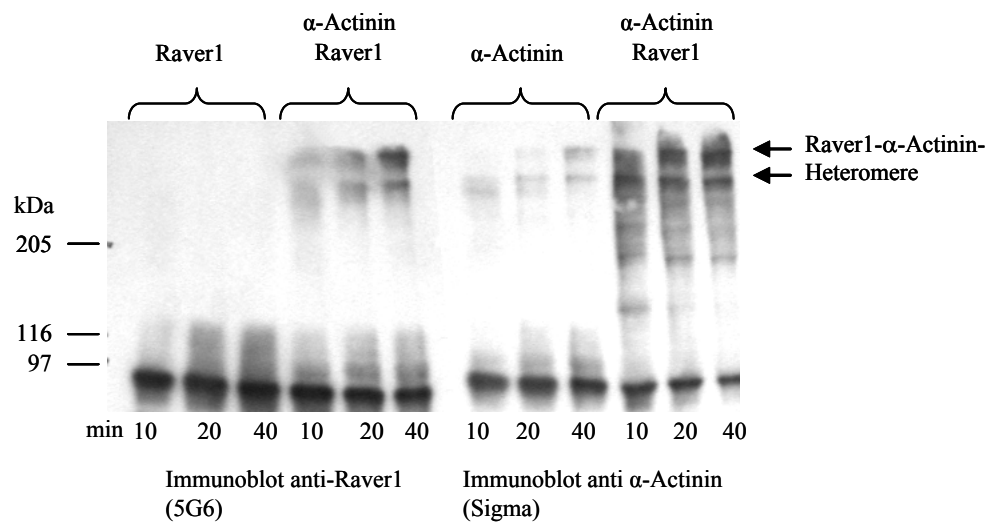


Abbildung 16: Raver1 bindet an α -Actinin im „crosslink“-Experiment

Je 25 pmol der Proteine wurden mittels des "crosslinkers" EDC/NHS quervernetzt. Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeiten abgestoppt, die Ansätze durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit dem Raver1-Antikörper 5G6 bzw. einem α -Actinin-Antikörper nachgewiesen. α -Actinin bildet Homomere aus, Raver1 zeigt keine Selbstassoziation. Die Pfeile deuten auf Heteromere, aus Raver1 und α -Actinin bestehende Komplexe.

Die Interaktion von rekombinantem Raver1 mit α -Actinin konnte auch in einem „Spot-Overlay“ bestätigt werden. Hierfür wurde α -Actinin in steigenden Konzentrationen an einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit rekombinantem Raver1-Protein überschichtet. Gebundenes Protein wurde mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen (Abb. 17). Raver1 zeigte eine Bindung an α -Actinin, jedoch nicht an das als Negativ-Kontrolle immobilisierte BSA. Im Gegensatz zur Interaktion von Raver1 mit Vinculin und Metavinculin hatte die Präinkubation mit PIP₂ keinen Einfluss auf die Bindung an α -Actinin.

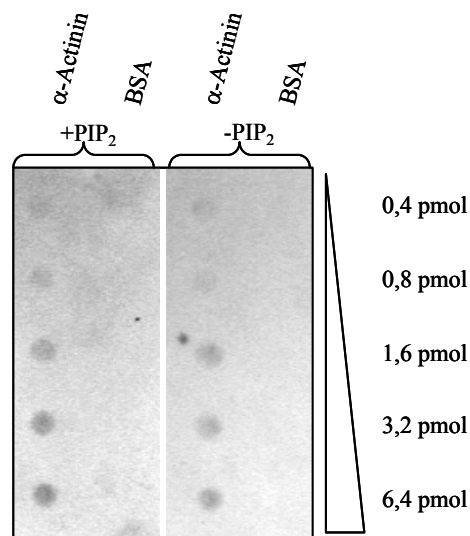


Abbildung 17: Raver1 bindet im Spot-Overlay an α -Actinin

0,4 bis 6,4 pmol α -Actinin wurden auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit rekombinantem Raver1 (3 μ g/ml) überschichtet. Ein Teil der Analysen (linke Abbildung) erfolgte nach Präinkubation des Raver1-Proteins mit PIP₂. Gebundenes Protein konnte mittels FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. Raver1 bindet an α -Actinin, jedoch nicht an als Kontrolle immobilisiertes BSA. PIP₂ hat hierbei keinen Einfluss auf die Bindung.

Die Bindungsregion für α -Actinin war im C-terminalen Bereich von Raver1 nachgewiesen worden (Hüttelmaier et al., 2001). Daher wurde das Bindungsverhalten des rekombinanten, C-terminalen-Raver1-Deletionskonstrukts auf seine α -Actinin-Bindungseigenschaften hin überprüft (Abb. 18). In „crosslink“-Experimenten zeigte dieses verkürzte Raver1-Fragment, im Gegensatz zum in Kapitel 3.1.2.1 verwendeten N-terminalen-Konstrukt, keine Homomer-Ausbildung; in Anwesenheit von α -Actinin wurden jedoch höhermolekulare Komplexe gebildet, die sowohl vom FLAG-Antikörper, als auch von den α -Actinin-Antikörpern erkannt wurden (Abb. 18A). Hierbei handelt es sich somit um aus Raver1 und α -Actinin bestehende Heteromere.

In ELISA-Bindungsstudien (Abb. 18B), in denen 25 pmol α -Actinin an einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen (2,5 bis 50 pmol) Raver1 Δ N inkubiert wurden, band rekombinantes Raver1 Δ N ebenfalls an α -Actinin. Die physische Interaktion von Raver1 mit α -Actinin konnte hiermit biochemisch bewiesen und frühere Beobachtungen konnten somit verifiziert werden. Die Bindung von Raver1 an α -Actinin erfolgt über die C-terminale Hälfte von Raver1.

Vergleichende Analysen mit immobilisiertem VT und MVT zeigten erwartungsgemäß keine oder nur eine schwache Interaktion, da die Bindung an VT/MVT über den N-Terminus von Raver1 erfolgt (Abb. 15).

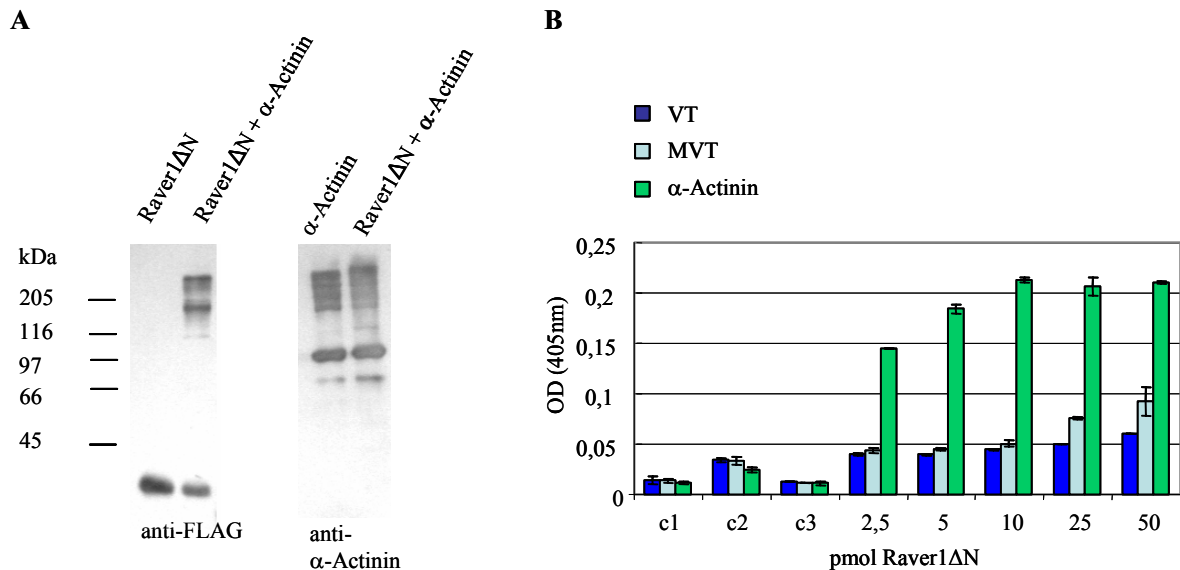


Abbildung 18: Raver1ΔN bindet im „chemical crosslink“ und ELISA an α-Actinin

A: „Crosslink“ mit rekombinantem Raver1ΔN und α-Actinin. Die Western-Blots wurden mit dem FLAG-Antikörper (links) oder einem α-Actinin-Antikörper (rechts) entwickelt. Raver1 und α-Actinin bilden Heteromere aus. B: 25 pmol VT, MVT und α-Actinin wurde an einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen rekombinanten Raver1ΔN-Proteins inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper (anti-Raver1 7D3) nachgewiesen. Raver1ΔN bindet an α-Actinin jedoch nicht an VT/MVT. Die dargestellten Balken stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten mit angegebener Standardabweichung dar.

c1= Kontrolle mit BSA anstatt VT, MVT, α-Actinin, c2= Kontrolle ohne Raver1ΔN, c3= Kontrolle ohne Raver1-Antikörper

3.1.2.3 Interaktion mit PTB

Das „polypyrimidine tract-binding protein“ PTB (hnRNPI) ist bisher der einzige Interaktionspartner von Raver1 im Zellkern (Kapitel 1.2.2.1). Auch die Interaktion von Raver1 mit PTB sollte auf biochemischer Ebene überprüft werden. Hierfür wurden ebenfalls „chemical crosslink“ Experimente durchgeführt und im Western-Blot ausgewertet (Abb. 19A). Mit Raver1 und PTB im Ansatz erschienen mit dem Raver1-Antikörper 5G6 nachweisbare Banden, die aufgrund der Tatsache, dass Raver1 keine Homodimere ausbildet und aufgrund des apparenten Molekulargewichts als Raver1-PTB-Heterodimere interpretiert werden müssen. Diese Heterodimere konnten nicht parallel mit dem zur Verfügung stehenden PTB-Antikörper erkannt werden. Vermutlich war das entsprechende Epitop nach dem „chemical crosslink“ der Proteine maskiert. Daher sollte die Raver1-PTB-Interaktion zusätzlich im „spot overlay“ (Abb. 19B) und im ELISA (Abb. 19C) überprüft werden. Steigende Konzentrationen (0,4 bis 6,4 pmol) PTB wurden an einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit rekombinantem Raver1-Protein überschichtet. Der Nachweis gebundenen Proteins erfolgte mit dem Raver1-spezifischen Antikörper 5G6 und einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Zur Kontrolle wurden Ansätze ohne ersten Antikörper und mit immobilisiertem BSA (in Abb. 17 dargestellt) durchgeführt. Raver1 zeigte eine Bindung an das immobilisierte PTB, die zunehmende Signalstärke spiegelt dabei die PTB-Konzentrationsreihe wieder (Abb. 19B).

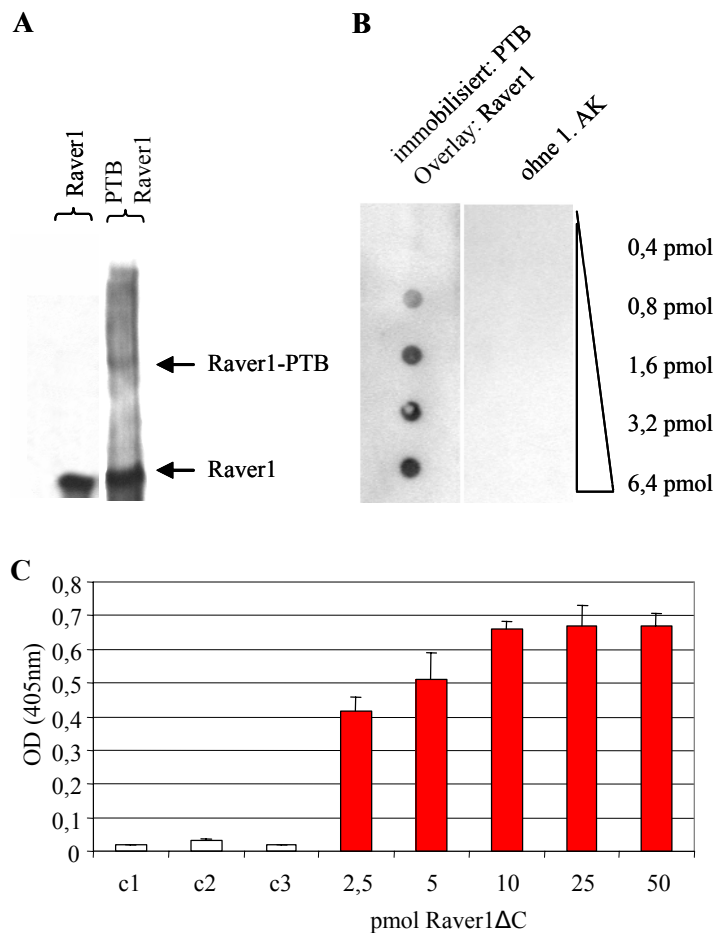


Abbildung 19: Rekombinantes Raver1 Protein bindet an PTB

A: „Chemical crosslink“ Experiment mit rekombinalem Raver1 und PTB. Der Versuch wurde im Western-Blot mit anti-Raver1-Antikörper (5G6) und HRP-gekoppeltem 2. Antikörper analysiert. B: Raver1-PTB-Spot-Blot. PTB wurde in steigenden Konzentrationen (0,4- 6,4 pmol) an einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit rekombinalem Raver1 (3 µg/ml) inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper (5G6) nachgewiesen. Als Kontrolle diente ein Parallelansatz ohne 1. Antikörper. C: ELISA: 25 pmol PTB wurde an den „wells“ einer ELISA-Platte immobilisiert und mit Raver1ΔC überschichtet (von 2,5 bis 50 pmol). Gebundenes Protein wurde mit einem Raver1-Antikörper (5G6) nachgewiesen. c1= Kontrolle mit BSA statt PTB, c2= Kontrolle ohne Raver1ΔC, c3= Kontrolle ohne Raver1-Antikörper

Untersuchungen im Rahmen der Erstbeschreibung von Raver1 (Hüttelmaier et al., 2001) deuten darauf hin, dass sich die PTB-Bindungsregion im Raver1 N-Terminus befindet. Dies wurde in ELISA-Experimenten mit dem rekombinanten Raver1-N-Terminus (Raver1ΔC) überprüft (Abb. 19C). Die „wells“ einer ELISA-Platte wurden mit 25 pmol PTB beschichtet, und mit steigenden Raver1ΔC-Konzentrationen (von 2,5 bis 50 pmol) inkubiert. Gebundenes Protein wurde dem Raver1-Antikörpern 5G6 nachgewiesen. Schon bei 2,5 pmol Raver1ΔC liegen die Absorptionswerte eindeutig über den erzielten Kontrollwerten und bei etwa 25 pmol rekombinalem Raver1ΔC wird eine Sättigung erreicht. Sowohl im Spot-Blot als auch im „chemical crosslink“ Experiment konnte somit die direkte

Raver1-PTB-Bindung biochemisch bestätigt werden. Das ELISA-Experiment zeigt, dass sich die PTB-Bindungsregion im N-Terminus von Raver1 befindet; dieser Befund stimmt mit früheren Hinweisen überein (Hüttelmaier et al., 2001).

3.2 Raver1 ist ein Aktin-bindendes Protein

Raver1 zeigt im Muskel eine möglicherweise differenzierungsbedingte Translokation aus dem Zellkern ins Cytoplasma (Kapitel 1.2.1). Daher ist es besonders interessant, im Muskel nach weiteren Raver1-Liganden zu suchen. Zur Identifikation möglicher neuer, Raver1-spezifischer Bindungspartner wurden „Yeast Two-Hybrid“-Analysen mit zwei Muskel-Genbanken von Clontech („Human Aorta MATCHMAKER cDNA Library“, „Human Heart MATCHMARKER cDNA Library“) durchgeführt (Kapitel 2.2.2.21).

Nach Elimination „falsch positiver“ Klone, die entweder ein falsches Leseraster aufwiesen oder eine positive Reaktion mit einem Kontrollvektor (Kernlamin C) aufwiesen, konnten einige Proteine als potentielle neue Raver1-Liganden identifiziert werden (Tabelle 7). Mit 4 Klonen wurde Aktin als häufigster Bindungspartner identifiziert. Da Aktin zudem zunehmend als wichtiger Kofaktor zentraler Kernprozesse beschrieben wird (Rando et al., 2000; Pederson & Aebi, 2002; Sahlas et al., 1993; Philimonenko et al., 2004) und auch an nucleocytoplasmatischen Transportprozessen beteiligt ist (Hofmann et al., 2001; Percipalle et al., 2001) wurde im Folgenden der Fokus auf die Raver1-Aktin Interaktion gerichtet.

Tabelle 7: Tabelle potentieller in „Yeast Two-Hybrid“-Analysen identifizierter Raver1-Liganden

Potentielle, aus der humanen Herzbank identifizierte Raver1 Interaktionspartner
Aktin (4x)
"gp-130 associated protein"
Desmin
Potentielle, aus der humanen Glattmuskelbank identifizierte Raver1 Interaktionspartner
"mitogen-activated protein kinase 7" MAPK7 (Erk5)
"gp-130 associated protein"
"transforming growth factor beta1 induced transcript"
Fibronectin (2X)

3.2.1 Interaktion mit Aktin *in vitro*

Während die Aktindynamik und Konformation im Cytoplasma gut verstanden ist, ist bis heute nicht geklärt, wie Kernaktin organisiert ist (Kapitel 1.1.1.2). Da eine Anfärbung von Kernaktin mit Phalloidin nicht möglich ist, wird allgemein angenommen, dass es sich bei Kernaktin um Monomere oder kurze Oligomere handeln muss. Zudem mehren sich die Hinweise auf die Existenz von sogenanntem „lower dimer“ (LD)-Aktin, das aus zwei G-Aktin-Untereinheiten besteht, die in einer eigenen, nicht F-Aktin-ähnlichen Konformation vorliegen (Millonig et al., 1988; Steinmetz et al., 1997).

Es stellt sich daher zunächst die grundsätzliche Frage, mit welcher Aktinkonformation, ob G-, F-, oder LD-Aktin, Raver1 interagiert. Bei der Klärung dieser Frage ergibt sich teilweise die experimentelle Problematik, wie die Aktinkonformation im Versuchsverlauf aufrechterhalten werden kann. Zudem ist es nicht möglich alle Experimente gleichermaßen mit G- und F-Aktin durchzuführen.

Zunächst wurde die Frage, welche Aktinkonformation möglicherweise von Raver1 gebunden wird in *in vitro* Studien untersucht. Es wurden ELISA-Analysen durchgeführt (Abb. 20), in denen 25 pmol polymerisiertes F-Aktin oder ECP-Aktin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Y. Khaitlina, Russische Akademie der Wissenschaften) an die „wells“ einer Mikrotiterplatte gekoppelt wurden. ECP-Aktin ist ein mit der *E.coli*-A2-Protease ECP32 behandeltes Aktin, welches seine native Konformation beibehält, jedoch in Gegenwart von Calcium-Ionen nicht mehr polymerisiert (Khaitlina et al., 1991; Khaitlina et al., 1993) und daher in diesem Versuch eine G-Aktin-ähnliche Konformation einnimmt. Des weiteren wurde LD-Aktin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C.-A. Schoenenberger, M.E. Müller Institut, Biozentrum, Universität Basel), welches mittels „chemical crosslinks“ von G-Aktin hergestellt wird, auf einer ELISA-Platte immobilisiert. Die gekoppelten Proteine wurden mit steigenden Raver1-Konzentrationen überschichtet. Die Bindung von rekombinantem Raver1-Protein konnte mittels des FLAG-Antikörpers (M2, Sigma) und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen werden. Raver1 zeigte sowohl eine Interaktion mit immobilisiertem F- und G-(ECP-) Aktin sowie auch mit LD-Aktin, band jedoch nicht an das als Negativkontrolle eingesetzte BSA. Die Raver1-Interaktion mit LD-Aktin wurde zusätzlich in einem „Pulldown“ Experiment untersucht (Abb. 20C). Nach Koinkubation von 75 pmol rekombinantem Raver1-Protein mit 75 pmol LD-Aktin wurden Ni-NTA- „Magnetic Beads“, an welche Raver1 über seinen His-Fusionsanteil bindet, zu dem Ansatz hinzugefügt, um Raver1 zu präzipitieren. Die Analyse der Pellet- und Überstands-Fraktionen erfolgte im Coomassie Brilliant Blue gefärbtem SDS-Gel. LD-Aktin band auch in diesem Versuch an Raver1 und befand sich zusammen mit Raver1 im Pellet. In einem Kontrollansatz ohne Raver1 fand sich etwas LD-Aktin zusammen mit den Ni-NTA-„Magnetic Beads“ im Pellet wieder, dieser Anteil war jedoch deutlich geringer als in Gegenwart von Raver1. Diese Versuche zeigen, dass Raver1 *in vitro* mit allen hier getesteten Aktin-Konformationen interagiert.

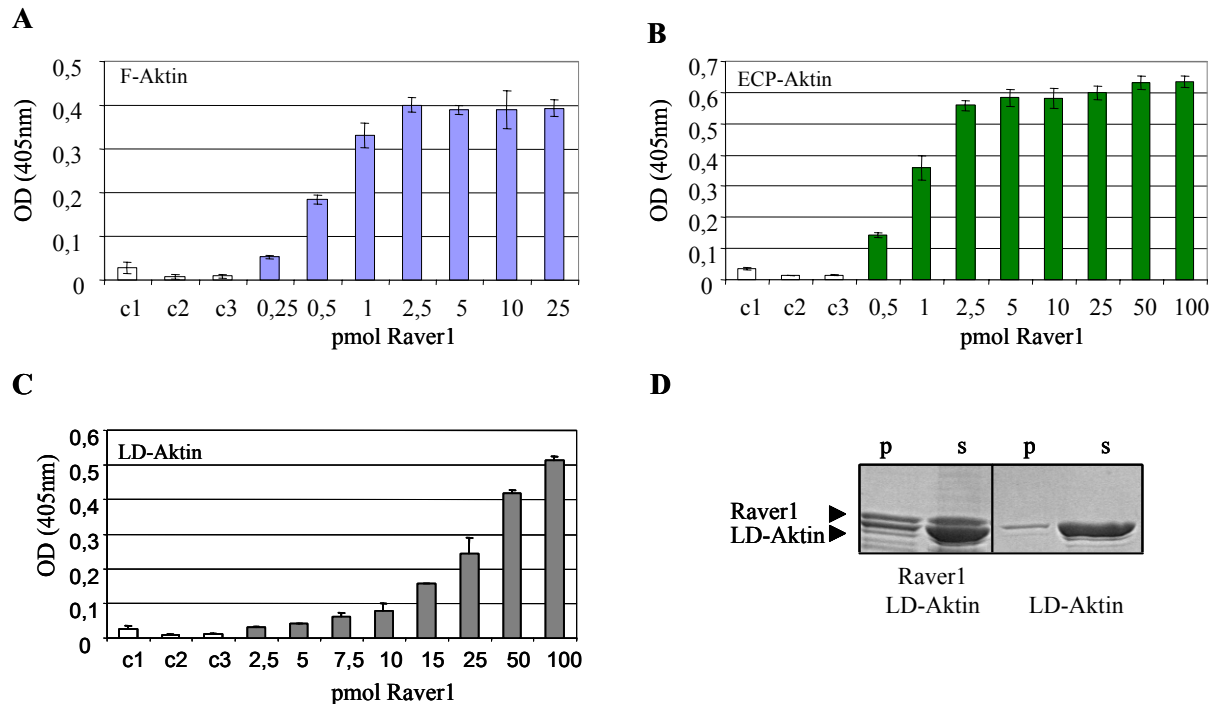


Abbildung 20: Raver1 interagiert mit F-, G-, und LD-Aktin

25 pmol F-Aktin (A), ECP-Aktin (G-Aktin, B) oder LD („lower dimer“)-Aktin (C) wurden immobilisiert und mit steigenden Mengen rekombinantem Raver1-Protein inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit dem FLAG-Antikörper (M2, Sigma) und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Experimenten mit angegebener Standardabweichung dar. Raver1 bindet sowohl an F-, ECP- als auch LD-Aktin. c1: Kontrolle ohne Aktin; c2: Kontrolle ohne Raver1; c3: Kontrolle ohne Erstantikörper.

(D): Raver1 bindet im „Magnetic Bead Pulldown“-Experiment an LD-Aktin. Nach Inkubation von 75 pmol Raver1 mit 75 pmol LD-Aktin wurden Ni-NTA-„Magnetic Beads“ dem Ansatz zugefügt, an die rekombinantes Raver1 mittels des His-Fusionsanteils bindet. Gebundenes Proteine (p) und der Überstand (s) wurden im SDS-Gel analysiert. LD-Aktin bindet an Raver1 und befindet sich im Pellet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Raver1.

In weiteren ELISA-Tests sollte analysiert werden, in welchem Bereich von Raver1 sich die Aktinbindungsstelle(n) befindet/befinden (Abb. 21A). An den „wells“ einer ELISA-Platte immobilisiertes F-Aktin wurde mit dem rekombinanten Raver1 C-Terminus (Raver1ΔN, AS 442-748) oder dem komplementären rekombinanten Raver1 N-Terminus (Raver1ΔC, AS 1-441) überschichtet. Gebundenes Protein konnte mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Raver1ΔN interagiert deutlich mit immobilisiertem F-Aktin, während die Signale für Raver1ΔC deutlich schwächer waren. Es ist somit anzunehmen, dass sich die Hauptaktinbindungsregion im C-Terminus von Raver1 befindet. Das C-terminale Raver1-Fragment Raver1ΔN band ebenfalls im „chemical crosslink“ Experiment an das mit der *E.coli*-A2-Protease ECP 32 behandelte und somit nicht mehr polymerisationsfähige Aktin (ECP-Aktin) und bildete Komplexe aus (Abb. 21B). Diese

Komplexbildung wurde nach einem „chemical crosslinking“ im SDS-Gel mit nachfolgendem Western-Blot zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem FLAG-Antikörper, der rekombinantes Raver1-Protein erkennt, verfolgt. Raver1 Δ N wies, wie bereits in Abbildung 18 gezeigt, keine Selbstassoziation auf; in Gegenwart von ECP-Aktin kam es zur Komplexbildung. Das Molekulargewicht dieser Komplexe ähnelte nach 5- und 10-minütigem „crosslink“ dem von Raver1 Δ N-ECP-Aktin-Dimeren, nach einer 15-minütigen Inkubation traten auch höhere Oligomere auf. Im Zeitverlauf nahm die Intensität des Signals für Raver1 Δ N-Monomer ab. Der Raver1-C-Terminus interagiert somit in „chemical crosslink“ Experimenten mit nicht mehr polymerisationsfähigen, G-Aktin-ähnlichen ECP-Aktin (Abb. 21B), in ELISA-Studien mit F-Aktin (Abb. 21A).

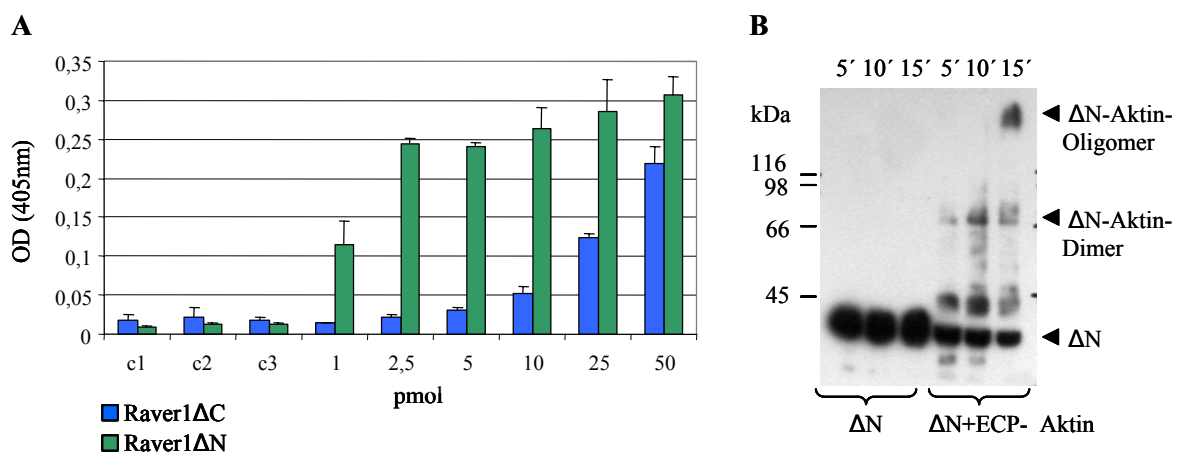


Abbildung 21: Raver1 Δ N bindet an F-Aktin und ECP-Aktin

A: Die Aktinbindungsregion von Raver1 liegt im C-Terminus: F-Aktin (25 pmol) wurde an einer ELISA-Platte immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen (von 1 bis 50 pmol) an rekombinantem Raver1 Δ C- bzw. Raver1 Δ N-Protein überschichtet. Gebundenes Protein wurde mit dem FLAG-Antikörper (M2, Sigma) und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Raver1 Δ N zeigt eine starke Bindung an F-Aktin, die Absorptionswerte erreichen schnell eine Sättigung, während die Bindung von Raver1 Δ C an Aktin vergleichsweise schwach ist. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Experimenten mit angegebener Standardabweichung dar. c1: Kontrolle ohne Aktin; c2: Kontrolle ohne Raver1-Fragment; c3: Kontrolle ohne Erstantikörper

B: Je 100 pmol Raver1 Δ N-Fusionsprotein und ECP-Aktin wurden mittels des „crosslinkers“ EDC/NHS quervernetzt. Die Reaktionen wurden zu den angegebenen Zeiten abgestoppt, die Ansätze durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit einem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Raver1 Δ N zeigt keine Selbstassoziation. In Gegenwart von ECP-Aktin kommt es zur Ausbildung von Raver1 Δ N-Aktin-Dimeren und -Oligomeren. Raver1 Δ N und ECP-Aktin bilden Komplexe aus. Δ N: Raver1 Δ N

In einem weiteren Festphasenassay sollte die Aktinbindungsregion im Raver1-C-Terminus verifiziert werden. Hierfür wurden „Overlay“-Experimente durchgeführt. 10 pmol präpolymerisiertes Aktin, G-Aktin, die Vinculinschwanzdomäne (VT) oder BSA wurden auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten Raver1-Konstrukten inkubiert. Gebundenes Protein konnte mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß band Gesamt-Raver1 an VT (Kapitel 1.2.2.2), das hier als Positivkontrolle verwendet wurde, jedoch nicht an das als Negativkontrolle immobilisierte BSA (Abb. 22). Auch der Raver1-N-Terminus (Raver1ΔC) zeigte, entsprechend vorhergehender Studien (Kapitel 3.1.2.1 dieser Arbeit und Hüttelmaier et al., 2001), eine zumindest schwache Bindung an VT. Ebenso interagierte dieses Konstrukt schwach mit F-Aktin. Ein wesentlich stärkeres Signal ergab sich aus dem „Overlay“ von F-Aktin mit *in vitro* translatiertem Raver1ΔN und dem Raver1-Gesamtprotein; eine Interaktion von Raver1 mit G-Aktin konnte in diesem Versuch abweichend von den ELISA-Experimenten (Abb. 20) nicht bestätigt werden. Ein generelles Problem ist es jedoch, dass keine Aussagen darüber getroffen werden können, wie sich die Immobilisierung von Proteinen auf deren Konformation auswirkt. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass der hier angenommenen Polymerzustand von Aktin (globulär und filamentös) nicht mit der tatsächlichen Konformation des immobilisierten Proteins übereinstimmt.

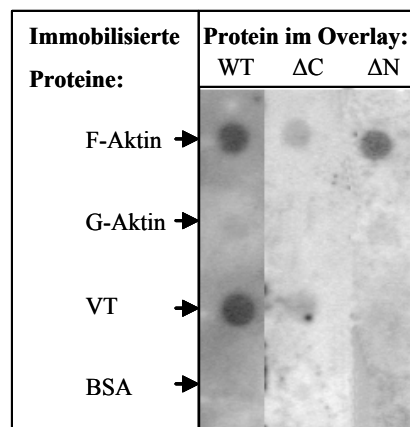


Abbildung 22: Interaktion von [³⁵S]-markierten Raver1-Konstrukten mit Aktin im "Dot-Overlay"-Assay

Jeweils 10 pmol F-Aktin, G-Aktin, VT und BSA wurden auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten Raver1-Konstrukten inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. Gesamt-Raver1 (WT) zeigt eine deutliche Interaktion mit F-Aktin und VT, Raver1ΔC (AS 1-441) bindet schwach an F-Aktin und VT, Raver1ΔN (AS 442-748) zeigt eine starke Interaktion mit F-Aktin.

Die F-Aktin-Bindung von Raver1 sollte in Kosedimentationsstudien näher untersucht werden. Durchgeführt wurden sowohl Kosedimentationsexperimente bei 100000 x g („high speed“) und 12000 x g („low speed“) (Kapitel 2.2.2.9). Steigende Konzentrationen des rekombinanten Raver1 Proteins wurden zu 3 μ M präpolymerisiertem Aktin gegeben, und nach einstündiger Inkubation wurden die Aktinfilamente durch „high speed“- oder „low speed“-Zentrifugation sedimentiert. Eine Analyse der Pellet- und der Überstands-Fraktionen erfolgte im SDS-Gel. Zudem wurden Kontrollen mit rekombinantem Raver1 oder Aktin durchgeführt. Bei der „high speed“-Kosedimentation wird die generelle Bindung von Raver1 an Aktin untersucht. Das entsprechende Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gel ist in Abbildung 23A dargestellt. Raver1 war nach 100000 x g Zentrifugation zusammen mit Aktin im Pellet zu finden. Allerdings war auch das rekombinante Raver1-Protein in Abwesenheit von F-Aktin nach Zentrifugation der Kontrolle (c1) im Pellet zu finden. Eine eindeutige Aussage über die Aktinbindung von Raver1 kann somit anhand dieses Versuchs nicht getroffen werden.

Um den Einfluss von Raver1 auf die Aktinfilamentorganisation zu untersuchen, wurden zusätzlich Kosedimentationsassays nach „low speed“-Zentrifugation durchgeführt. Während bei der „high speed“-Zentrifugation das gesamte filamentöse Aktin und alle assoziierten Proteine sedimentieren, findet man bei einer Zentrifugation mit 12000 x g lediglich in Suprastrukturen organisierte Aktinfilamente, wie z.B. filamentöse Netzwerke oder zu Bündeln quervernetzte Filamente im Pellet (Rüdiger et al., 1998). Abbildung 23A zeigt das Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gel der „low speed“-Kosedimentation. Auch hier befand sich Raver1 nach Zentrifugation ohne Aktin im Pellet. Im Gegensatz dazu verblieb Aktin im Kontrollansatz (c2) zum Großteil im Überstand. Wurden die molaren Verhältnisse von Raver1 zu Aktin erhöht, führte dies zu einer Zunahme der pelletierbaren Aktinmenge. Dies könnte auf eine Quervernetzung der Aktinfilamente durch Raver1 hinweisen.

Die potentielle Bildung von Raver1-induzierten Aktinsuprastrukturen wurde daher auch fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dazu wurde Aktin mit rekombinantem Gesamt-Raver1-Protein unter polymerisierenden Bedingungen koinkubiert und die gebildeten Filamente nach Markierung mit Phalloidin-TRITC fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 23B). Es zeigte sich auch hierbei, dass die Gegenwart von Raver1 die Ausbildung von Aktinsuprastrukturen bewirkt, die abhängig vom molaren Verhältnis der eingesetzten Proteine ein unterschiedliches Erscheinungsbild zeigten. Bereits bei niedrigen molaren Verhältnissen von Raver1/Aktin (Abb. 23b) war eine deutliche Filamentbildung im Vergleich zur Aktinkontrolle (Abb. 23a) zu beobachten. Mit steigenden Raver1-Konzentrationen im Ansatz nahm nicht nur die Filamentlänge, sondern auch deren Vernetzung zu (Abb. 23d).

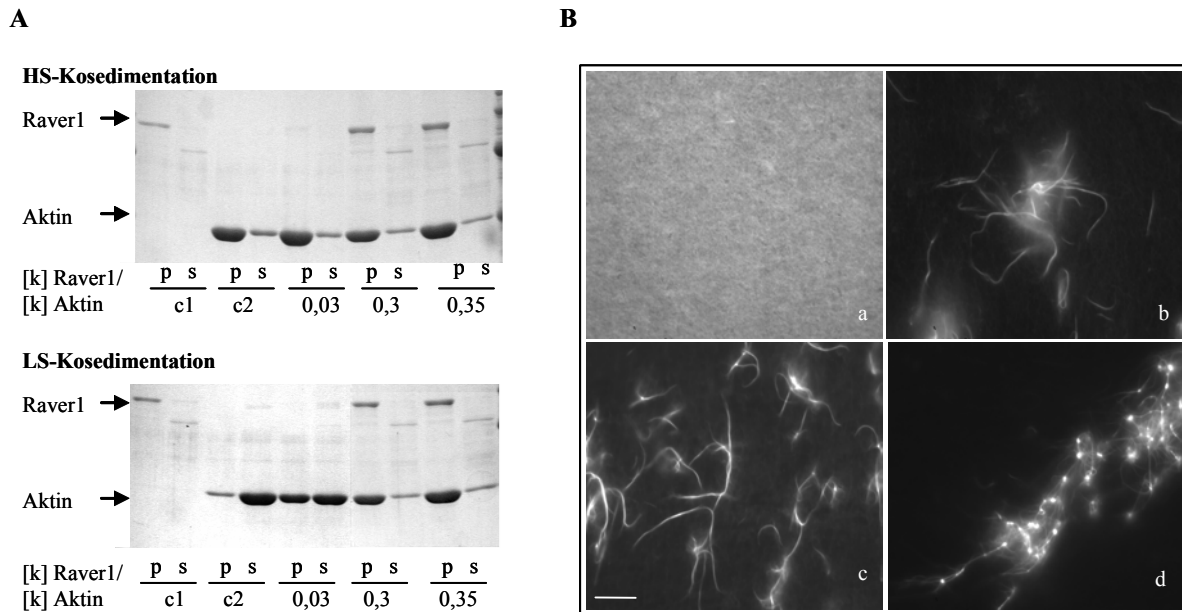


Abbildung 23: Raver1 bindet an F-Aktin und führt zu Ausbildung von Aktinsuprastrukturen

A: „High speed“- und „low speed“-Kosedimentation von Raver1 und Aktin: Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gele der Pellet (p)- und Überstands (s)-Fraktionen nach „high speed“ (HS)- und „low speed“ (LS)-Kosedimentation. Die molaren Verhältnisse von Raver1 zu Aktin (0,03-0,35) sind angegeben, als Kontrolle wurden Raver1 (c2) und Aktin (c2) allein zentrifugiert. Raver1 befindet sich in den Pelletfraktionen. In der LS-Kosedimentation werden sedimentierbare Aktinsuprastrukturen gebildet.

B: *In vitro* Analyse der durch Gesamt-Raver1 erzeugt Aktinsuprastrukturen. Rekombinantes Raver1-Protein und Aktin (3 μ M) wurden unter polymerisierenden Bedingungen in verschiedenen molaren Verhältnissen koinkubiert. Die Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-TRITC dargestellt und mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet. Raver1 induziert die Bildung von Aktinsuprastrukturen

a: Aktinkontrolle ohne Raver1; b: Raver1-Aktin 1:10; c: Raver1-Aktin 1:5; d: Raver1-Aktin 1:2

Aufgrund der bisher durchgeführten „high speed“- und „low speed“- Kosedimentationen konnte keine eindeutige Aussage über die Raver1-F-Aktin-Bindung getroffen werden, denn auch rekombinantes Gesamt-Raver1-Protein allein befand sich unter den für die Erhaltung der F-Aktin-Konformation nötigen Pufferbedingungen nach Zentrifugation im Pellet. Die „low speed“-Kosedimentation (Abb. 23A) und die *in vitro* Analyse von Aktinsuprastrukturen (Abb. 23B) deuten jedoch auf eine Bündelung oder Quervernetzung von Aktinfilamenten durch Raver1 hin. Da in vorhergegangene Experimenten (Abb. 21, 22) die Hauptaktinbindungsstelle im Raver1-C-Terminus lokalisiert werden konnte, wurde der rekombinante C-Terminus (Raver1 Δ N, AS 442-748) ebenfalls in Kosedimentationsanalysen eingesetzt. Abbildung 24A zeigt das Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gel der „high speed“-Kosedimentation (100000 x g) aus der eindeutig hervorgeht, dass Raver1 über den C-Terminus spezifisch an F-Aktin bindet. Zwar sedimentierte auch in dieser Analyse etwa die Hälfte des Raver1 Δ N-Proteins in der Kontrolle (c2), in Anwesenheit von Aktin war das eingesetzte Fragment

jedoch fast ausschließlich in der Pelletfraktion zu finden. Die mit diesem Fragment durchgeführten „low speed“ Untersuchungen bestätigten zudem die Filamentbündelung/-organisation durch Raver1: mit Zugabe steigender Raver1 Δ N-Mengen nahm der Anteil der pelletierten Aktinfilamente im Vergleich zur Aktinkontrolle (c1) deutlich zu.

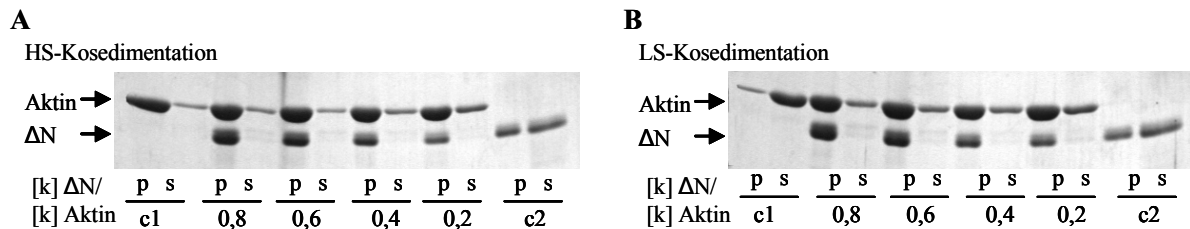


Abbildung 24: Raver1 Δ N bindet an F-Aktin

A: „High speed“-Kosedimentation von Raver1 Δ N und Aktin. Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel der Pellet (p)- und Überstands (s)-Fraktionen. Raver1 Δ N bindet an Aktin und sedimentiert.

B: Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel der Pellet (p)- und Überstands (s)-Fraktionen nach „low speed“-Kosedimentation von Raver1 Δ N und Aktin. Raver1 Δ N induziert pelletierbare Aktinsuprastrukturen.

Die molaren Verhältnisse von Raver1 Δ N zu Aktin sind angegeben (0,8-0,2), als Kontrollen wurden Aktin (c1) und Raver1 Δ N (C2) allein zentrifugiert.

Einige Aktin-bindende Proteine wie z.B. VASP ("vasodilator-stimulated phosphoprotein") und Calponin zeigen *in vitro* eine starke Abhängigkeit der Aktin-Interaktion von der Ionenstärke des verwendeten Puffers (Hüttelmaier et al., 1999; Tang et al., 1997). So ist die VASP-Aktin-Bindung unter physiologischen Salzbedingungen (150 mM KCl) im Vergleich zu Niedrigsalzbedingungen (25 mM KCl) reduziert, was auf eine elektrostatische Wechselwirkung der beiden Proteine schließen lässt. Da die bisherigen Untersuchungen bei Niedrigsalzbedingungen durchgeführt worden waren, sollte nun die Raver1-Assoziation mit Aktin in Anwesenheit steigender Salzkonzentrationen untersucht werden. Hierfür wurden ELISA- und Kosedimentationsstudien durchgeführt. 25 pmol F-Aktin wurden an den „wells“ einer ELISA-Platte immobilisiert und mit 5 bzw. 10 pmol rekombinantem Raver1-Gesamtprotein bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (50-150 mM) inkubiert. Gebundenes Protein konnte mittels FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. Unter allen gewählten Bedingungen zeigte Raver1 eine deutliche Bindung an das immobilisierte Aktin, lediglich bei einer 150 mM KCl-Konzentration war die Interaktion im Vergleich zu einer 50 mM KCl-Konzentration leicht (um etwa 25%) reduziert (Abb. 25A). In Kosedimentationsstudien hatte die Salzkonzentration keinen nachweisbaren Einfluss auf die Bindung von Raver1 Δ N an Aktin (Abb. 25B). In „high speed“-Kosedimentationsanalysen bei 100000 x g assoziierte Raver1 Δ N mit Aktin und war nach Zentrifugation mittels Coomassie Brilliant Blue gefärbten SDS-Gel im Pellet nachzuweisen.

Aktin verblieb bei der „low speed“-Kosedimentation bei 12000 x g im Überstand, wurde jedoch in Gegenwart von Raver1 Δ N unter allen gewählten Bedingungen in sedimentierbare Suprastrukturen umorganisiert. Somit hatte eine erhöhte Salzkonzentration auch keinen Einfluss auf die Bündelung der Aktinfilamente durch Raver1 Δ N. *In vitro* interagieren Raver1 und Aktin somit, im Gegensatz zu VASP, auch unter physiologischen Salzbedingungen.

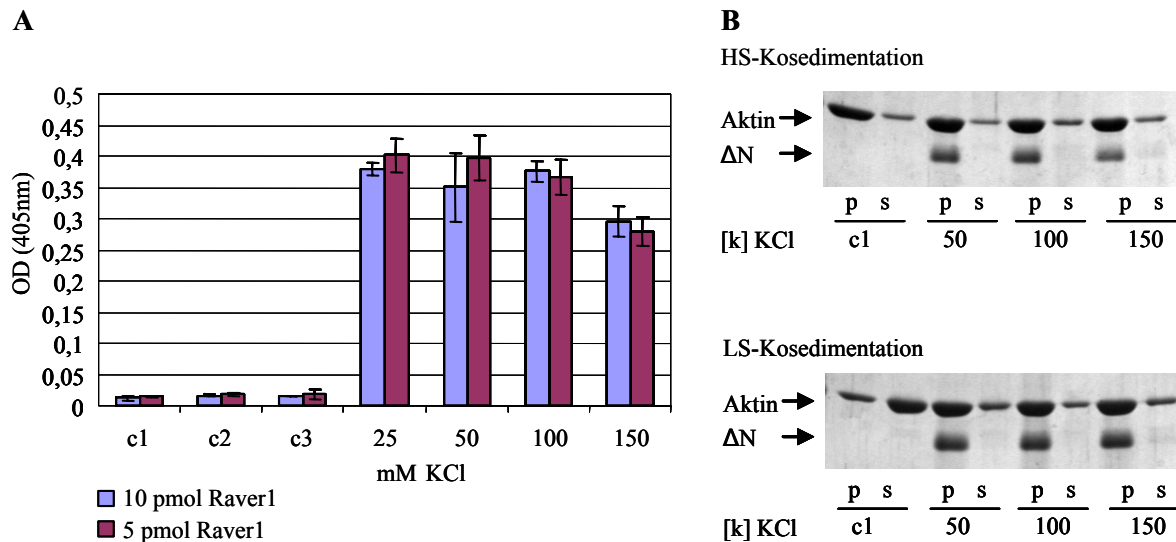


Abbildung 25: Raver1-Aktin-Interaktion bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen

A: ELISA-Studie zur Raver1-Aktin-Interaktion unter physiologischen Salzbedingungen. 25 pmol F-Aktin wurden an den „wells“ einer Mikrotiter-Platte immobilisiert, mit 5 bzw. 10 pmol rekombinantem Raver1-Fusionsprotein bei steigenden KCl-Konzentrationen (25-150 mM) überschichtet und im ELISA analysiert. Gebundenes Raver1-Protein wurde mit einem FLAG-Antikörper nachgewiesen. Raver1 bindet unter allen Bedingungen an Aktin, bei hohen Salzkonzentrationen (150 mM KCl) ist lediglich die Bindung um etwa 25% reduziert.

c1: Kontrolle ohne Aktin; c2: Kontrolle ohne Raver1-Fragment; c3: Kontrolle ohne Erstantikörper

B: „high speed“- und „low speed“-Kosedimentation von Raver1 Δ N und Aktin (Verhältnis Raver1 Δ N zu Aktin 0,6) bei steigenden Salzkonzentrationen. Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gele der Pellet (p) und Überstands (s)-Fraktionen nach „high speed“ (HS)- und „low speed“ (LS)-Kosedimentation. Die KCl-Konzentrationen im Endansatz sind angegeben (50-150mM). Raver1 Δ N bindet unter allen Bedingungen an Aktin und organisiert die Aktinfilamente in, unter LS-Bedingungen, pelletierbare Suprastrukturen.

c1: Aktinkontrolle; Δ N: C-terminales Raver1-Fragment (Raver1 Δ N (AS 442-748))

Aufgrund der vorliegenden *in vitro* Daten kann darauf geschlossen werden, dass Aktin ein neuer Ligand von Raver1 ist. Die wesentliche Bindungsregion für Aktin ist dabei im C-Terminus lokalisiert, und die Interaktion beider Proteine beruht nicht allein auf elektrostatischen Wechselwirkungen. *In vitro* ist Raver1 in der Lage, mit verschiedenen Aktinkonformationen zu interagieren. Aktinfilamente werden dabei zusätzlich quervernetzt und zu Suprastrukturen organisiert. Eine Bindung von G- und F-

Aktin durch dasselbe Protein wurde unter anderem bereits für VASP beschrieben (Walders-Harbeck et al., 2002). Während für VASP jedoch anzunehmen ist, dass beide Aktinkonformationen im Cytosol gebunden werden, ist für Raver1 durchaus denkbar, dass das Protein im Kern mit monomeren oder oligomeren Kernaktin und im Cytoplasma mit Aktinfilamenten interagiert.

3.2.2 Isolierung von Raver1-Aktin-Komplexen aus Zellen

Erste Hinweise auf die Interaktion von Raver1 und Aktin in einem zellulären Kontext sollte die Isolierung von Raver1-Aktin-Komplexen aus C2C12-Zellen geben.

Es wurden hierfür Gelfiltrationsanalysen (Durchführung siehe Kapitel 2.2.2.8) von C2C12-Extrakten undifferenzierter Zellen unter nativen Bedingungen durchgeführt und auf Raver1-haltige Fraktionen hin im Western-Blot überprüft. Raver1 konnte in insgesamt 10 aufeinanderfolgenden Elutions-Fraktionen (Fraktion 23-32; Abb. 26) nachgewiesen werden; weitere Raver1-Elutionsbereiche konnten in drei voneinander unabhängigen Versuchen nicht identifiziert werden. Die Analyse der Raver1-haltigen Elutionsfraktionen zeigte, dass die Raver1-Liganden PTB und Aktin ebenso in den Fraktionen enthalten waren, Vinculin und α -Actinin konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Vinculin eluierte erst deutlich später in den Fraktionen 49-60. Diese Fraktionen enthielten ebenfalls Aktin.

Die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit einem Eichstandard erlaubt es, Rückschlüsse auf die Größe der eluierten Proteine bzw. Proteinkomplexe zu ziehen. Anhand dieser Eichstandards muss für die Raver1-haltigen Fraktionen angenommen werden, dass es sich um Komplexe von etwa 900 kDa handeln muss. Dies deutet darauf hin, dass Raver1 in einem Multiproteinkomplex eingebunden ist, in dem auch PTB und Aktin enthalten sind.

Immunfluoreszenz-Analysen und Zellfraktionierungen zeigen (Abb. 37; K. Falley, Diplomarbeit), dass Raver1 in undifferenzierten C2C12-Zellen fast ausschließlich im Kern lokalisiert ist und dort teilweise mit PTB kolokalisiert (Hüttelmaier et al., 2001). Es ist somit wahrscheinlich, dass es sich bei den Raver1-haltigen Fraktionen um Kernkomplexe mit Kernaktin handelt, die Vinculin-haltigen Fraktionen könnten hingegen cytoplasmatische Aktin-Vinculin-Komplexe darstellen.

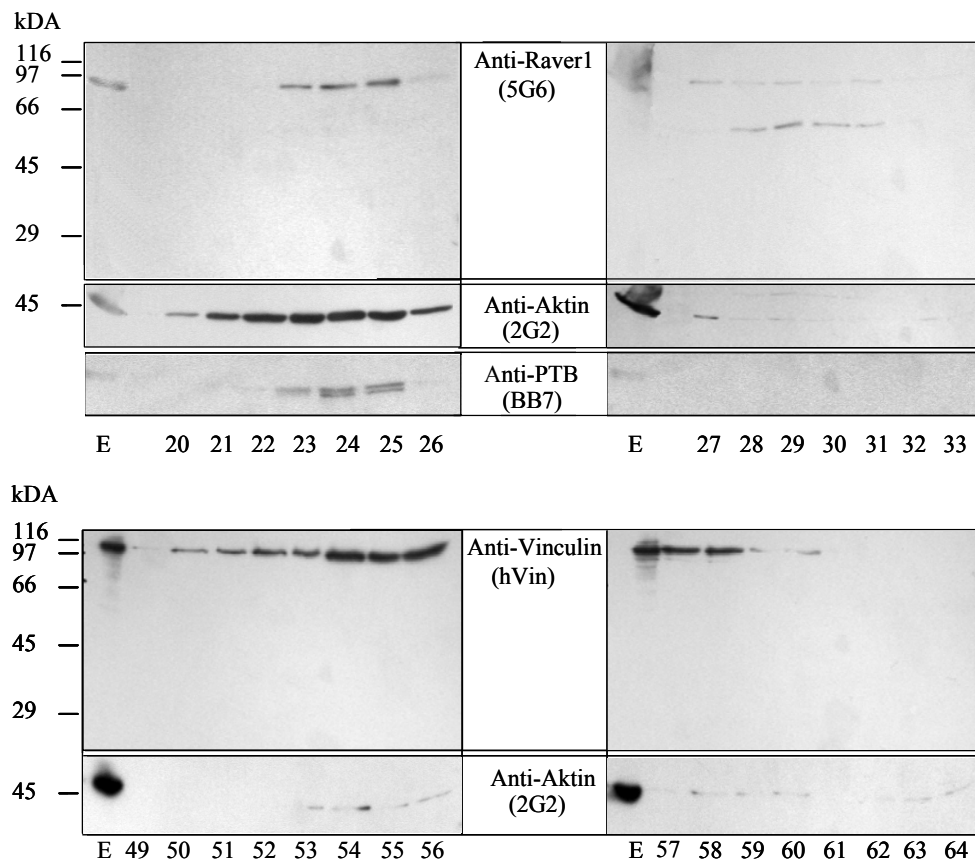


Abbildung 26: Raver1, Aktin und PTB liegen in C2C12-Zellen in einem Komplex vor

Gelfiltrationsanalyse von C2C12-Zelllysaten unter nativen Bedingungen. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte im Western Blot, die Nummern geben die Elutionsfraktionen an. Raver1 kann in 10 Fraktionen (22-32) identifiziert werden, die auch Aktin enthalten. Ebenfalls kann PTB in Fraktion 23-26 nachgewiesen werden. Vinculin findet sich in den Fraktionen 49-60; auch in diesen Fraktionen ist nachzuweisen.

E: auf die Gelfiltrationssäule aufgetragener Gesamtzellextrakt.

Raver1-haltige Fraktionen wurden im Anschluss Immunpräzipitationsanalysen unterzogen, um eine zufällige Koelution mit Aktin auszuschließen. Wie die Western-Blot-Analyse zeigt (Abb. 27), konnte Raver1 mit einem spezifischen Antikörper (Anti-Raver1 5G6) aus diesen Fraktionen präzipitiert werden. In dem Präzipitat ließ sich auch Aktin nachweisen. Als Negativkontrolle wurden Fraktionen verwendet, die Aktin, jedoch kein Raver1-Protein enthielten. Im umgekehrten Fall konnte auch nach Immunpräzipitation von Aktin aus Raver1-haltigen Fraktionen Raver1 im Kopräzipitat nachgewiesen werden. Die entsprechende Negativkontrolle konnte hierbei nicht durchgeführt werden, denn es wurden bisher keine Raver1-haltigen Fraktionen ohne Aktin identifiziert. Insgesamt sprechen diese Untersuchungen dafür, dass Raver1 und Aktin direkt in den isolierten Proteinkomplexen miteinander interagieren.






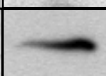
IP		anti-Raver1		anti-Aktin	Blot
		1	2		
Raver1 ▶					anti-Raver1
Aktin ▶					anti-Aktin

Abbildung 27: Ko-Immunpräzipitation von Raver1 und Aktin nach Gelfiltration

Raver1-haltige Gelfiltrationsfraktionen (Abb. 26) wurden einer Immunpräzipitation mit einem Raver1-Antikörper unterzogen. Das Präzipitat wurde im Western-Blot analysiert. Es konnte sowohl Raver1 als auch ko-präzipitiertes Aktin nachgewiesen werden (1). Die Kontrolle einer zwar Aktin- jedoch nicht Raver1- haltigen Fraktion zeigte, dass Aktin nicht unspezifisch an den Antikörper oder an die Protein-G-Sepharose bindet (2). Auch bei Verwendung eines Aktin-Antikörpers konnte im Präzipitat Raver1 nachgewiesen werden. Beide Proteine liegen somit in den Gelfiltrationsfraktionen in demselben Komplex vor.

In einem weiteren Experiment konnten auch in HeLa X1/5-Zellen Raver1 und Aktin nach Immunpräzipitation in einem Komplex nachgewiesen werden (Abb. 28). HeLa X1/5-Zellen wurden, um eine bessere Präzipitation der Komplexe zu gewährleisten, mit einem Raver1-FLAG-Konstrukt transient transfiziert. Dieses Raver1-Konstrukt lokalisierte wie das Raver1-WT-Protein zum Großteil im Zellkern (Hüttelmaier et al., 2001). Nach *in situ* "crosslinking" zur Stabilisierung von Proteinkomplexen wurde eine Immunpräzipitation mit dem FLAG-Antikörper durchgeführt (genaue Durchführung siehe Kapitel 2.2.2.14). Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot. Das Raver1-FLAG-Fusionsprotein konnte mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. Aktin ko-präzipitierte mit dem Fusionsprotein und konnte ebenfalls im Blot mit einem spezifischen Antikörper (2G2) nachgewiesen werden. Die durchgeführte Negativkontrolle, in der untransfizierte Zellen verwendet wurden, zeigte eindeutig, dass der eingesetzte FLAG-Antikörper keine Kreuzreaktion mit Aktin aufweist, und dass Aktin nicht unspezifisch an die zur Präzipitation der Komplexe eingesetzte Protein-G-Sepharose bindet. Im Vergleich zu den mit Gelfiltrationsfraktionen durchgeführten Immunpräzipitationen (siehe Abb. 27) fällt auf, dass, bedingt durch die transiente Transfektion der Zellen, Raver1 in großen Mengen präzipitiert werden kann und dementsprechend viel Aktin ko-präzipitiert. Das Verhältnis Raver1 und Aktin zueinander scheint jedoch bei beiden Präzipitationen identisch zu sein.



	1	C	Blot
Raver1 ►			anti-FLAG (M2, Sigma)
Aktin ►			anti-Aktin (Sigma)

Abbildung 28: Ko-Immunpräzipitation von Raver und Aktin aus HeLaX1/5-Zellen

HeLa X1/5-Zellen wurden transient mit einem FLAG-Raver1-Fusionsprotein transfiziert. Das Raver1-Fusionsprotein wurde nach *in situ* "crosslinking" aus dem Zelllysats mittels FLAG-Antikörper präzipitiert und das Präzipitat im Western-Blot analysiert. Der Nachweis des Raver1-Fusionsproteins erfolgte mit dem FLAG-Antikörper. Aktin ko-präzipitiert mit Raver1 (1). Als Kontrolle diente ein Proteinextrakt untransfizierter Zellen (C); hier erfolgt keine Aktin-Präzipitation.

Diese Analysen zeigen, dass Raver1 und Aktin in den hier verwendeten C2C12- und HeLa XI/5-Zellen in einem Komplex vorliegen. Zusammen mit den in Kapitel 3.2.1 gewonnenen *in vitro* Daten bestätigt dies die Vermutung, dass es sich bei Raver1 um ein Aktin-bindendes Protein handelt. In welchem Kompartiment der Zelle diese Interaktion stattfindet, ist mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht abschließend zu klären. Eine Bindung der Proteine im Zellkern ist jedoch sehr wahrscheinlich, da Raver1 in den analysierten Zellen primär im Kern lokalisiert. Die durchgeführten *in vitro* Analysen zeigen eine Interaktion von Raver1 sowohl mit globulärem als auch mit filamentösem Aktin. Um erste Hinweise auf eine mögliche G-Aktin-Bindung *in vivo* zu erhalten, wurden DNase I-Pulldown-Experimente mit Zellextrakten undifferenzierter C2C12-Zellen durchgeführt. DNase I bindet bevorzugt globuläres Aktin und könnte demzufolge nicht nur mit cytoplasmatischem G-Aktin sondern auch mit Kernaktin wechselwirken. Mit DNase I-gekoppelte Sepharose wurden mit C2C12-Zellextrakten inkubiert und die gebundenen Proteine im SDS-Gel mit nachfolgendem Western-Blot analysiert (Abb. 29). Aktin zeigte erwartungsgemäß eine Bindung an DNase I, präzipitierte aber ebenfalls mit der zur Kontrolle eingesetzten BSA-gekoppelten Sepharose auch wenn in der Kontrolle das Aktinsignal etwas schwächer war. Raver1 war in beiden Präzipitaten nur sehr schwach nachweisbar. Mittels DNase-Präzipitation konnte daher keine G-Aktinbindung von Raver1 nachgewiesen werden. Allerdings ist dieser Versuch nicht ausreichend um eine Interaktion auszuschließen. Zum einen könnte das gebundene Aktin vorwiegend aus dem cytoplasmatischen Pool stammen, für das aufgrund der Datenlage keine Interaktion mit Raver1 angenommen werden kann. Andererseits könnte durch die Bindung der DNase die Interaktion von Aktin mit Raver1 behindert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es daher nicht möglich, die Frage der G-Aktin-Bindung von Raver1 abschließend zu klären.

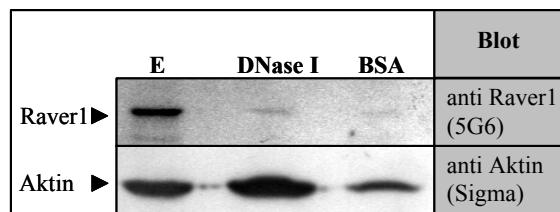


Abbildung 29: DNase I-Pulldown aus C2C12-Zellextrakten

C2C12-Zellextrakte wurden mit DNase I-gekoppelter (DNase I) oder BSA-gekoppelter (BSA) Sepharose inkubiert. Gebundenes Protein wurde im SDS-Gel mit anschließendem Western-Blot mit einem Raver1-Antikörper (5G6) und einem Aktin-Antikörper analysiert. Parallel wurde Gesamtzellextrakt (E) aufgetragen. Aktin bindet an DNase I-Sepharose und auch, zu einem geringeren Anteil an BSA-gekoppelte Sepharose. Für Raver1 konnte nur ein sehr schwaches Signal sowohl mit den DNase I-Sepharose als auch mit der BSA-Kontrolle nachgewiesen werden. Ein eindeutiger Nachweis einer möglichen G-Aktin-Bindung von Raver1 ist in diesem Versuchsansatz daher nicht möglich.

3.3 Mögliche Regulationsmechanismen

Durch biochemische Analysen konnte bewiesen werden, dass Raver1 direkt mit PTB, VT, MVT und α -Actinin interagiert. Die Interaktion mit diesen Liganden muss abhängig vom zellulären Kontext reguliert werden. Eine solche Regulation könnte direkt Einfluss auf die Komplexbildung von Raver1 mit anderen Proteinen nehmen, zum anderen könnte die Komplexbildung indirekt durch die gezielte Regulation der subzellulären Lokalisation beeinflusst werden. Ersteres könnte durch die Interaktion von Raver1 durch PIP_2 geschehen. Hinweise auf eine PIP_2 -Interaktion von Raver1 ergab bereits die biochemische Analyse der VT/MVT-Bindung im ELISA (Abb. 13). Zudem werden viele Aktin-bindende Proteine, zu denen auch Raver1 gezählt werden muss (Kapitel 3.2), durch saure Phospholipide reguliert.

Die subzelluläre Lokalisation von Raver1 könnte hingegen durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Entsprechende Beobachtungen wurden bereits für den Raver1-Liganden PTB (Kapitel 1.1 und 1.2.2.1) gemacht.

3.3.1 Interaktion mit sauren Phospholipiden

Da viele Cytoskelett-assoziierte Proteine trotz fehlender Phosphoinositid-Bindungsmotive wie PH (Pleckstrin-Homologie)-Domänen oder FYVE-Domänen durch Lipide reguliert werden (Sechi & Wehland, 2000, Kapitel 4.2) wurde eine mögliche Bindung von Raver1 an Phospholipide überprüft, obwohl in Aminosäuresequenzanalysen des Raver1-Proteins keine Lipid-Bindungsmotive identifiziert werden konnten. Hierfür wurde zunächst ein Protein-Lipid-Overlay-Experiment durchgeführt und die

Bindung von rekombinantem Raver1-Protein an auf Nitrocellulose immobilisierte Phospholipide (Molecular Probes) überprüft (Abb. 30). Die Nitrocellulose wurde mit rekombinantem Raver1-Protein überschichtet. Gebundenes Protein konnte mittels FLAG-Antikörper nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Raver1 mit Phospholipiden in der folgenden Spezifitätsreihenfolge interagierte: Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P) > PtdIns(4)P > PtdIns(4,5)P₂ > PtdIns(3,5)P₂ > PS > PtdIns(5)P > PtdIns(3,3)P₂ > PtdIns(3,4,5)P₃. Kaum oder keine Bindung wurde für Lysophosphatidsäure (LPA), Lysophosphocholin (LPC), PtdIns, Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingosin-1-phosphat (S1P) nachgewiesen.

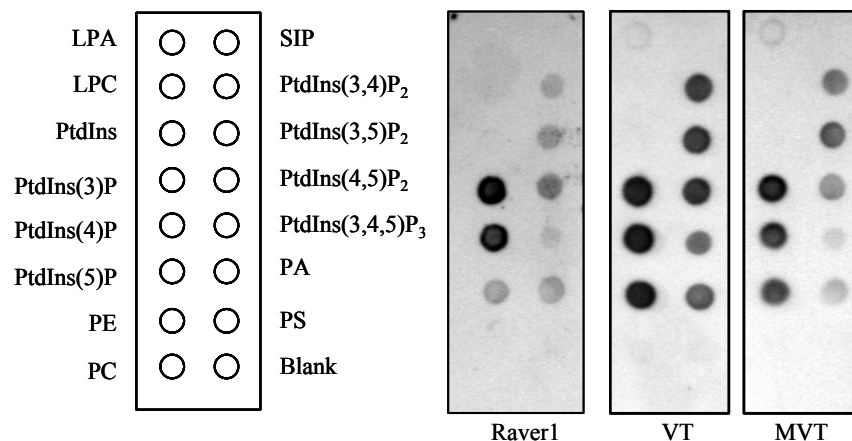


Abbildung 30: Phosphoinositide binden an Raver1

Nitrocellulosemembranen auf denen je 100 pmol der angegebenen Phospholipide immobilisiert waren (PIP Strips™, Molecular Probes) wurden mit rekombinanten Proteinen (Raver1, VT, MVT) überschichtet. Gebundenes Protein wurde mittels FLAG-Antikörper und Peroxidase-gekoppeltem 2. Antikörper nachgewiesen.

LPA=Lysophosphatidsäure, LPC=Lysophosphocholin, PtdIns=Phosphatidylinositol, PE=Phosphoethanolamin, PC=Phosphatidylcholin, SIP=Sphingosin-1-phosphat, PA=Phosphatidsäure, PS=Phosphatidylserin, Blank= Kontrolle ohne Phospholipid

Zum Vergleich wurde ebenso die Bindung der Vinculin- und der Metavinculinschwanzdomäne an Phospholipide im Lipid-Overlay untersucht (Abb. 30). Für beide Proteine ist die Bindung an Phospholipide bereits beschrieben (Burn & Burger, 1987; Ito et al., 1983; Niggli et al., 1986, Witt et al., 2004). Im Spot-Overlay zeigten sie ein ähnliches Muster wie Raver1, was für die Spezifität der Raver1-Bindung an die immobilisierten Lipide spricht.

Ein ELISA-Test sollte die Bindung von Raver1 an PIP₂ bestätigen. Hierbei wurden 50 pmol Raver1-Protein an die „wells“ einer Mikrotiterplatte gebunden und mit steigenden PIP₂-Konzentrationen (1-500 pmol) überschichtet. Die PIP₂-Bindung des rekombinanten Raver1-Proteins konnte mit einem PIP₂-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Kapitel 2.2.2.4) und ist in Abbildung 31 dargestellt. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Protein, ohne Phospholipid und ohne PIP₂-spezifischen Antikörper durchgeführt. Bereits bei geringen PIP₂-Konzentrationen (5-50 pmol) wurden

höhere Absorptionswerte als in den Kontrollansätzen erreicht, die auch bis 500 pmol PIP₂ kontinuierlich anstiegen. Dieser Versuch bestätigt die Interaktion von Raver1 mit dem sauren Phospholipid PIP₂.

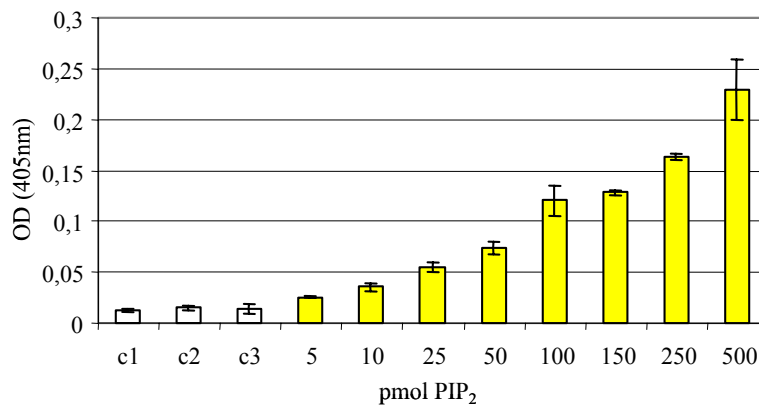


Abbildung 31: PIP₂-ELISA mit rekombinantem Raver1-Protein

50 pmol Raver1 wurden an eine Mikrotiterplatte gebunden und mit PIP₂ überschichtet. PIP₂ bindet an Raver1 und konnte mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten mit angegebener Standardabweichung dar. c1: Kontrolle ohne Protein, c2: Kontrolle ohne Phospholipid, c3: Kontrolle ohne PIP₂-Antikörper

Die Verwendung der rekombinanten Raver1-Deletionsfragmente Raver1ΔN und Raver1ΔC im PIP₂-ELISA sollte einen Hinweis auf die Lage der Phospholipidbindungsregion(en) geben. Der Versuch wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Eine Interaktion mit PIP₂ konnte für beide Deletionsfragmente nachgewiesen werden (Abb. 32), wobei sie sich jedoch in ihrer Bindungsstärke leicht unterscheiden und Raver1ΔN eine etwas stärkere Bindung aufwies. Die Phospholipidbindungsregion(en) konnte(n) mit diesem Versuch somit nicht weiter eingegrenzt werden, das Ergebnis deutet jedoch auf das Vorhandensein mehrerer Interaktionsbereiche hin.

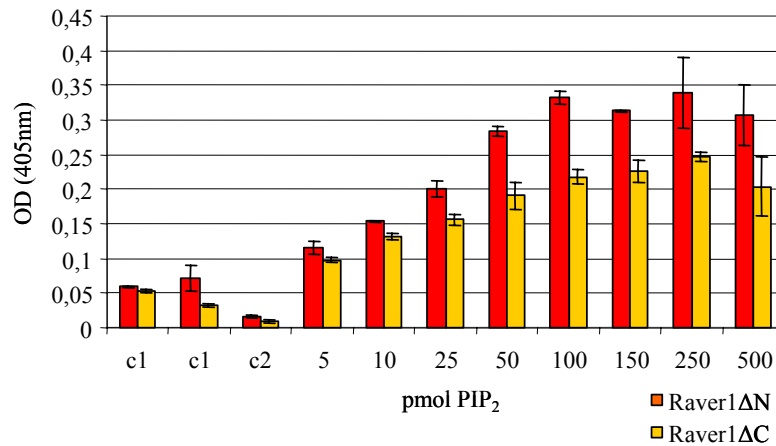


Abbildung 32: Die rekombinanten Deletionsfragmente Raver1ΔN und Raver1ΔC binden im ELISA an PIP₂

Jeweils 50 pmol der rekombinanten Deletionsfragmente wurden an die Mikrotiterplatte gekoppelt und mit steigenden Konzentrationen PIP₂ überschichtet, welches mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte. Sowohl Raver1ΔN als auch Raver1ΔC interagieren mit PIP₂. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten mit angegebener Standardabweichung dar. c1: Kontrolle ohne Protein, c2: Kontrolle ohne Phospholipid, c3: Kontrolle ohne PIP₂-Antikörper

Nachdem die Bindung von Raver1 an saure Phospholipide, insbesondere PIP₂ gezeigt werden konnte, sollte ein möglicher Einfluss dieser Bindung auf die Raver1-Aktin-Interaktion in sogenannten „Magnetic Bead Pulldown“-Experimenten geprüft werden. Rekombinantes Raver1-Fusionsprotein bindet über einen His-Fusionsanteil an Ni-NTA-„Magnetic Beads“ und kann so präzipitiert werden. Raver1-bindende Proteine befinden sich mit Raver1 im Pellet, ungebundenes Protein verbleibt im Überstand. Die Analyse der Fraktionen erfolgte im SDS-Gel (Abb. 33A). Während das als Negativkontrolle verwendete BSA erwartungsgemäß keine Bindung an Raver1 zeigte und im Überstand verblieb, konnte Aktin unter polymerisierenden Bedingungen mit Raver1 kopräzipitiert werden. Die Aktinmenge, die im Kontrollansatz ohne Raver1 ins Pellet gelangte, war vergleichsweise gering. Auch in diesem experimentellen Ansatz lässt sich somit die Interaktion von Raver1 und Aktin nachweisen. Nach Präinkubation von Raver1 mit steigenden PIP₂-Konzentrationen präinkubiert (3,3-facher bis 10-facher molarer Überschuss) wurde deutlich weniger Aktin kopräzipitiert. Da PIP₂-vorbehandeltes Raver1-Protein jedoch auch weniger effizient an die „magnetic beads“ gebunden wurde, wurde dieser Versuch mit dreimaliger Wiederholung densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis von gebundenem Aktin zu Raver1 im Pellet bestimmt (Abb. 33B). Diese Auswertung bestätigte, dass die Raver1-Aktin-Interaktion durch die Anwesenheit von PIP₂ negativ beeinflusst wird. Im ELISA-Experiment sollte dieser Einfluss von PIP₂ auf die Raver1-Aktin-Interaktion bestätigt werden. 25 pmol F-Aktin wurden an den „wells“ einer ELISA-Platte immobilisiert und mit 10 pmol rekombinantem Raver1 inkubiert. Erwartungsgemäß band Raver1 an das immobilisierte Aktin und

konnte mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 33C). Die vorherige Inkubation von Raver1 mit PIP_2 führte, wie auch im „Magnetic Bead Pulldown“-Experiment gezeigt, zur Inhibition der Raver1-Aktin-Interaktion. Somit ist Raver1 ein weiteres Aktin-assoziiertes Protein, das in seiner Wechselwirkung mit Aktin durch PIP_2 reguliert wird.

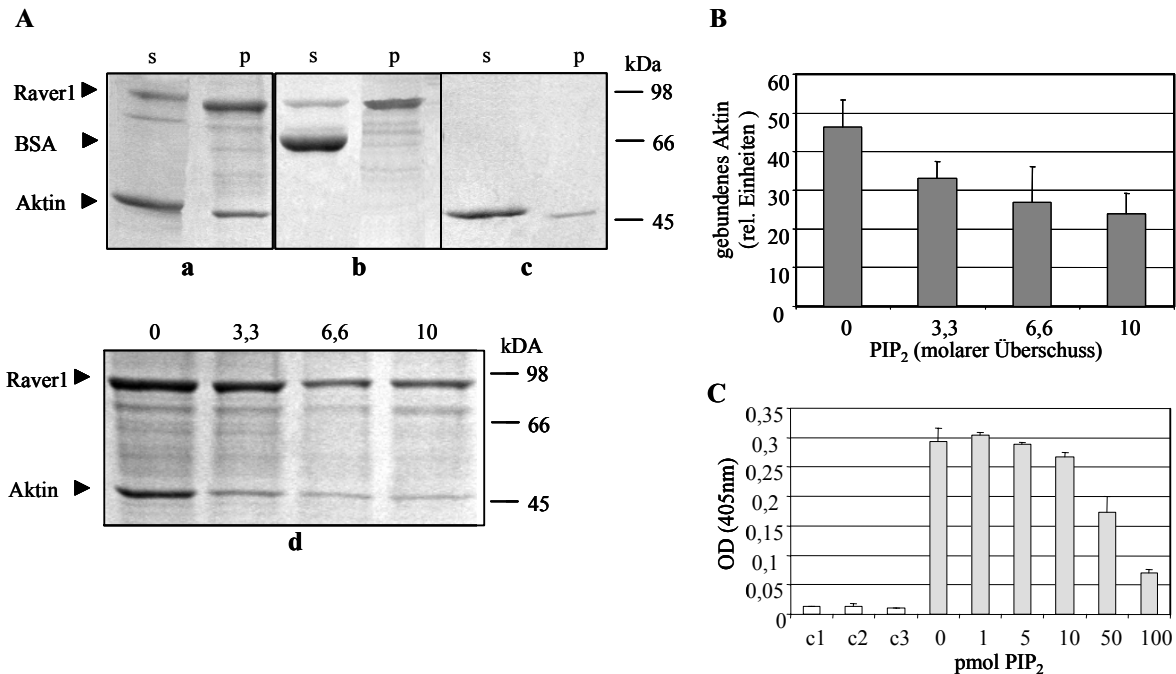


Abbildung 33: Die Raver1-Aktin-Interaktion wird durch PIP_2 moduliert

A: Coomassie Brilliant Blue gefärbte SDS-Gele von „Magnetic Bead Pulldown“ Experimenten. Raver1 wurde über seinen His-„tag“ an „Magnetic Beads“ gebunden und konnte so präzipitiert werden. Raver1-bindende Proteine befinden sich im Pellet (p), nicht gebundenes Protein verbleibt im Überstand (s). In Gegenwart von Raver1 befindet sich Aktin im Pellet (Aa), wohingegen in der Kontrolle ein Großteil des Aktins im Überstand verbleibt (Ac). Die Negativkontrolle BSA zeigt keine Interaktion mit Raver1 (Ab). Wird Raver1 mit PIP_2 präinkubiert (3,3-facher bis 10-facher molarer Überschuss) wird die Aktinbindung geschwächt (Ad).

B: Densitometrische Auswertung der Raver1-Aktin-Interaktion. Der in Abbildung Ad dargestellte Versuch wurde dreimal wiederholt. Das Verhältnis von gebundenem Aktin zu Raver1 wurde densitometrisch vermessen und ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die jeweilige Standardabweichung. Eine Präinkubation von Raver1 mit PIP_2 inhibiert die Aktinbindung.

C: Die „wells“ einer Mikrotiterplatte wurden mit 25 pmol F-Aktin beschichtet, mit 10 pmol rekombinantem Raver1-Fusionsprotein (z.T. nach vorheriger Inkubation mit PIP_2 (1-100 pmol)) inkubiert und im ELISA analysiert. Gebundenes Raver1-Protein wurde mittels eines spezifischen Antikörpers (5G6) gefolgt von einem Peroxidasegekoppelten 2. Antikörper nachgewiesen. Mit PIP_2 präinkubiertes Raver1-Protein zeigt eine verminderte Aktinbindung. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei parallel durchgeführten Experimenten mit der als Fehlerbalken angegebenen Standardabweichung dar.

c1: Kontrolle ohne Aktin; c2: Kontrolle ohne Raver1, c3: Kontrolle ohne 1. Antikörper

3.3.2 Phosphorylierung durch die Proteinkinase C-Alpha und Proteinkinase A

Für eine Vielzahl von Proteinen ist die Regulation durch Phosphorylierung beschrieben. Eine solche Regulation kann beispielsweise Ligandenwechselwirkungen modifizieren, wie es u.a. für das „vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP) beschrieben wurde (Harbeck et al., 2000). VASP kann durch die 3',5'-cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) phosphoryliert werden und zeigt im phosphorylierten Zustand eine verminderte G-Aktin-Bindung. Ebenso kann die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen, darunter viele Mitglieder der hnRNP-Familie, durch Phosphorylierung reguliert werden. So führt die Phosphorylierung von hnRNP-K durch die ERK-Kinase (MEK1) zu einer Akkumulation des Proteins im Cytoplasma, wohingegen unphosphoryliertes hnRNP-K primär im Nukleus lokalisiert (Habelhah et al., 2001). Auch für den Raver1-Liganden PTB wurde eine phosphorylierungsabhängige Verschiebung der intrazellulären Lokalisation beschrieben (Xie et al., 2003). PTB lokalisiert im unphosphorylierten Zustand im Zellkern, verlässt diesen jedoch nach der Phosphorylierung durch PKA und gelangt so ins Cytoplasma (Kapitel 1.2.2.1).

Die mögliche Bindung von Raver1 an Kinasen und eine eventuelle Phosphorylierung sollten zunächst *in vitro* untersucht werden, um so Hinweise auf die Regulation von Raver1 zu erhalten. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Kinasen getestet, PKA und Proteinkinase C α (PKC α). PKC α ist bekannt für die Phosphorylierung verschiedener cytoskelettaler Proteine, darunter auch Vinculin und Filamin (Kawamoto & Hidaka, 1984; Ziegler et al., 2002). PKA phosphoryliert das Raver1-verwandte Protein PTB.

Eine mögliche Interaktion von Raver1 und PKC α wurde in „Dot Overlay“-Experimenten näher untersucht (Abb. 34). 10 bzw. 25 pmol Raver1, VT und BSA wurden auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit *in vitro* translatierter, [³⁵S]-Methionin markierter PKC α inkubiert (Kapitel 2.2.2.18). Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. Da sowohl Raver1 als auch PKC α an saure Phospholipide binden (Kapitel 3.3.1; Nishizuka et al., 1984; Nishizuka et al., 1995) wurde parallel der Einfluss von sauren Phospholipiden auf die möglichen Wechselwirkungen untersucht, indem einzelne Ansätze der Proteine vor der Immobilisierung mit PIP₂ präinkubiert wurden. Auch die Vinculin-PKC α -Interaktion weist eine solche Lipid-Abhängigkeit auf (Ziegler et al., 2002) und diente hier als Positivkontrolle. Wie erwartet zeigte *in vitro* translatierte PKC α eine Bindung an VT, und diese Interaktion wurde durch die Anwesenheit von PIP₂ verstärkt. Auch mit immobilisiertem Raver1-Protein war eine eindeutige Interaktion mit PKC α zu verzeichnen. Allerdings hatte hierbei die Präinkubation mit PIP₂ keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung. Die Spezifität der Interaktion wurde durch immobilisiertes BSA als Negativkontrolle bestätigt. Insgesamt weisen die dargestellten Ergebnisse daher auf eine Interaktion von Raver1 mit PKC α hin.

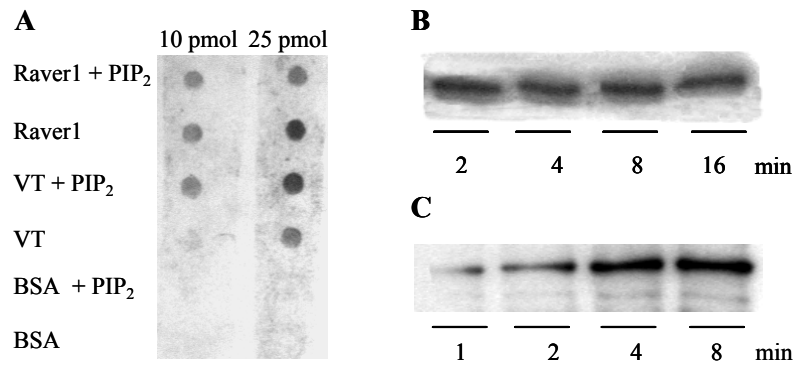


Abbildung 34: Raver1 bindet in Overlay-Experimenten an PKC α und wird *in vitro* von PKC α und PKA phosphoryliert

A: PKC α bindet *in vitro* an Raver1. „Dot Overlay“-Experiment mit *in vitro* translatierter, [³⁵S]-Methionin-markierter PKC α . 10 und 25 pmol rekombinantes Raver1-Protein wurde direkt oder nach Präinkubation mit PIP₂ (50-facher molarer Überschuss) auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die Membran wurde mit radioaktiv markierter PKC α inkubiert. Gebundene Kinase konnte mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. PKC α bindet an Raver1 und die Positivkontrolle VT (10 und 25 pmol), jedoch nicht an BSA (10 und 25 pmol). Die Präinkubation von VT mit PIP₂ verstärkt die Bindung, eine PIP₂-Präinkubation von Raver1 scheint sich nicht oder sogar negativ auf die Bindung auszuwirken.

B/C: *In vitro* Phosphorylierung von rekombinantem Raver1 durch PKC α (B) und die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein Kinase (PKA) (C). Die Phosphorylierung wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Die Proben wurde im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und der Phosphateinbau mittels Autoradiographie analysiert.

Ob Raver1 nicht nur an PKC α bindet sondern auch ein Substrat der Kinase darstellt, sollte mittels *in vitro* Phosphorylierungsstudien analysiert werden (genaue Durchführung siehe Kapitel 2.2.2.19). Die Phosphorylierung von Raver1 wurde nach definierten Zeiträumen (2, 4, 8, 16 min) durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und anschließend mittels Autoradiographie ausgewertet (Abb. 34B). Raver1 wurde hierbei von der PKC α phosphoryliert; wie Abbildung 34C zeigt, kann *in vitro* ebenso die Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit der PKA erfolgen. Die Kinetik dieser Phosphorylierung scheint im Vergleich zur Raver1-Phosphorylierung durch PKC α etwas langsamer zu sein; beiden Kinasen erreichen jedoch in etwa einen gleichen Phosphateinbau. Die Quantifizierung des radioaktiven Einbaus durch die PKA mittels Cerenkov-Zählung ergab einen geringen Phosphateinbau von 0,16 mol Phosphat pro mol Raver1, was ein Hinweis auf eine geringe Anzahl von Phosphorylierungsstellen sein könnte. Mittels Datenbankrecherchen konnten im Gesamt-Raver1-Protein neun potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen (Serin (S)-124, S-191, S-243, S-295, S-480, S-576, S-608, Threonin (T)-614, S-711) und sechs potentielle PKC α -Phosphorylierungsstellen (T-8, T-51, S-166, S-356, S-538, S-580) identifiziert werden. Die *in vitro* Phosphorylierung des N- und C-terminalen rekombinanten Raver1-Fragments sollte erste Hinweise auf die Lage der möglichen Phosphorylierungsstelle(n)

liefern. Hierfür wurden die rekombinanten Fragmente wie in Kapitel 2.2.2.19.1 beschrieben phosphoryliert. Die entsprechenden Autoradiographien sind in Abbildung 35 dargestellt. Das N-terminale Deletionskonstrukt (Raver1 Δ C) zeigte im Vergleich zum Gesamtprotein eine extrem verlangsamte Kinetik; ein schwacher Phosphateinbau ist erst nach 60-minütiger Phosphorylierung mittels Autoradiographie festzustellen. Raver1 Δ N wurde intensiver phosphoryliert, was darauf schließen lässt, dass sich die Hauptphosphorylierungsstelle(n) der PKA im C-terminalen Bereich von Raver1 befinden.

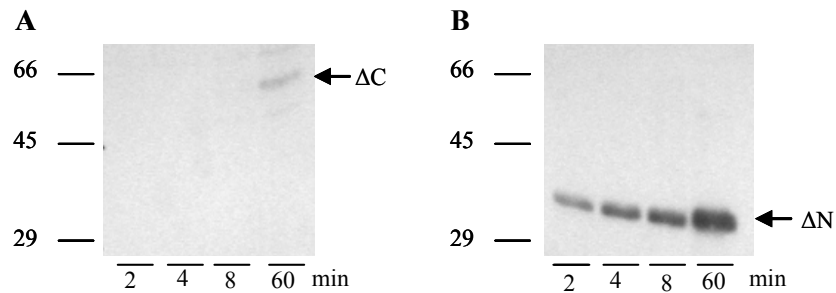


Abbildung 35: Die Hauptphosphorylierungsstelle der PKA befindet sich im Raver1-C-Terminus

Die Phosphorylierung von rekombinantem Raver1 Δ N- (B) und Raver1 Δ C-Protein (A) durch die katalytische Untereinheit der PKA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer terminiert. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetragen und auf Nitrocellulose transferiert. Der Phosphateinbau wurde mittels Autoradiographie analysiert. Der N-Terminus wird von der PKA kaum phosphoryliert; die Hauptphosphorylierungsstelle scheint im C-terminalen-Konstrukt (Raver1 Δ N) zu liegen.

Erste MALDI-TOF-Analysen (freundlicherweise von K. Thedieck, GBF-Braunschweig, durchgeführt) des in Insektenzellen exprimierten, rekombinanten Raver1 Δ N-Proteins weisen auf eine *in vivo* Phosphorylierung des Proteins bereits während der Expression hin und liefern damit erste Hinweise, auf eine physiologische Rolle der Raver1-Phosphorylierung. Die im MALDI-TOF identifizierte Phosphorylierungsstelle ist Serin-576, welches auch in Datenbankrecherchen als mögliche Phosphorylierungsstelle der PKA darstellen könnte.

3.4 Analyse der subzelluläre Lokalisation und Aktin-Assoziation von Raver1 in Myoblasten und Muskelgewebe

Die Identifizierung von Raver1 als Aktin bindendes Protein erforderte eine erneute Analyse der subzellulären Lokalisation des Proteins in Zellen und Geweben. Insbesondere eine mögliche direkte Assoziation mit cytoplasmatischem F-Aktin sollte gezielter untersucht werden.

3.4.1 Charakterisierung von Raver1-Antikörpern mit C-terminalem Epitop

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits ein monoklonaler Antikörper (5G6) verfügbar, dessen Epitop (ETVDDR) sich im extremen N-Terminus (AS 25-30) befindet. Diese Epitop ist jedoch nicht in allen Raver1-Proteinen verschiedener Spezies konserviert, so dass - insbesondere auch im Hinblick auf weiterführende Experimente – die Herstellung weiterer Antikörper gegen konservierte Sequenzbereiche sinnvoll erschien. Für die Immunisierung von Mäusen wurde daher ein synthetisches Peptid einer C-terminalen Sequenz (AS 718-727, Sequenz EPSPEGSYVG) eingesetzt.

Zwei spezifische monoklonale Antikörper (5D5; 7D3) konnten in Zusammenarbeit mit S. Buchmeier generiert werden und wurden zunächst in Western-Blot Experimenten auf ihre Spezifität überprüft (Abb. 36). Im Gegensatz zum N-terminalen Antikörper 5G6 erkannten beide C-terminalen Antikörper das Raver1-Protein nicht nur in den Zellextrakten muriner C2C12-Zellen, sondern auch in humanen HeLa X1/5-Zellen (Abb. 36A). Die unterschiedliche Position der Epitope ließ sich auch anhand rekombinanter Raver1-Proteine zeigen (Abb. 36B). Während das Gesamtprotein erwartungsgemäß von allen drei Antikörpern erkannt wurde, konnte durch den Antikörper 5G6 nur das N-terminale Fragment (Raver1 Δ C; AS 1-441) nachgewiesen werden, die neu generierten Antikörper 5D5 und 7D3 erkannten lediglich das C-terminale Fragment (Raver1 Δ N, AS 442-748). Bei den Blotanalysen fiel auf, dass beide Deletionsfragmente kaum degradiert werden, während ein deutlicher proteolytischer Abbau des Gesamtproteins zu verzeichnen war. Die Abbaufragmente wurden dabei lediglich durch den Antikörper 5G6 nachgewiesen, so dass die Proteolyse offensichtlich vom C-Terminus her erfolgte.

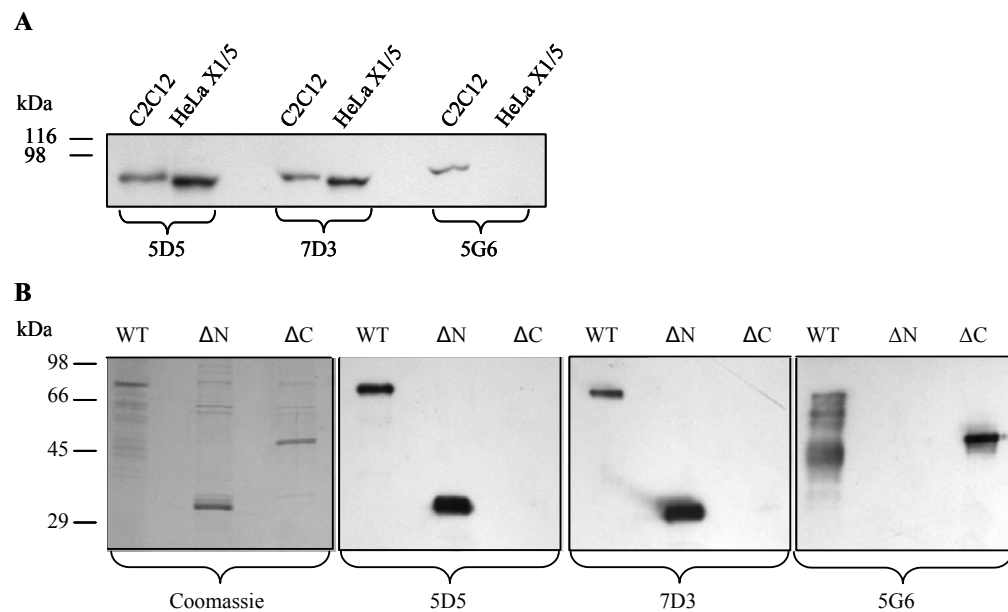


Abbildung 36: Spezifitätsnachweis der Raver1-Antikörper im Western-Blot

A: Verwendung von Raver1 Antikörpern im Western-Blot von C2C12- und HeLa-Zellextrakten.

Der Antikörper 5G6 erkennt Raver1 in Zellextrakten muriner C2C12-Zellen, jedoch nicht in humanen Zellextrakten (HeLa X1/5). Die neu generierten Raver1-Antikörper 5D5 und 7D3 zeigen diese Limitation nicht. Aufgrund der leicht unterschiedlichen Primärsequenz von murinem und humanem Raver1-Protein, ergibt sich ein divergentes Laufverhalten im SDS-Gel, was auch im Western-Blot als leicht verschobene Banden sichtbar ist.

B: Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-Gel und Western-Blots rekombinanter Raver1 Konstrukte.

Die neu generierten Antikörper 5D5 und 7D3 wurden im Vergleich zum 5G6-Antikörper auf ihre Eignung bei der Verwendung rekombinanter Proteine im Western-Blot getestet. Erwartungsgemäß erkennen alle Antikörper rekombinantes WT-Raver1-Protein. Das N-terminale Fragment (ΔC) wird nur durch den Antikörper 5G6 erkannt, während die Antikörper 5D5 und 7D3 ein deutliches Signal mit dem C-terminalen Fragment ΔN aufweisen. Proteolytische Abbaufragmente werden nur vom 5G6 erkannt, was auf eine Degradation des Gesamtproteins vom C-Terminus her deutet. WT: rekombinantes Raver1-Gesamtprotein; ΔN: C-terminales-Raver1-Fragment (AS 442-748); ΔC: N-terminales-Raver1-Fragment (AS 1-441)

Auch auf kultivierten Zellen verschiedener Spezies (C2C12, HeLa X1/5, PtK2) wurden alle drei Raver1 Antikörper in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben vorbehandelt und schließlich fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie erwartet wurde das Raver1-Protein von allen drei Antikörpern in C2C12-Zellen (Abb. 37) und außerdem in PtK2-Zellen aus der Beutelratte (nicht gezeigt) erkannt. Das humane Raver1-Protein in HeLa-X1/5-Zellen wurde lediglich von den gegen den C-Terminus gerichteten Antikörpern erkannt (nicht gezeigt) und bestätigte somit die immunochemischen Daten (Abb. 36). In allen Zellen war Raver1 im Zellkern lokalisiert unter Aussparung der Nukleoli.

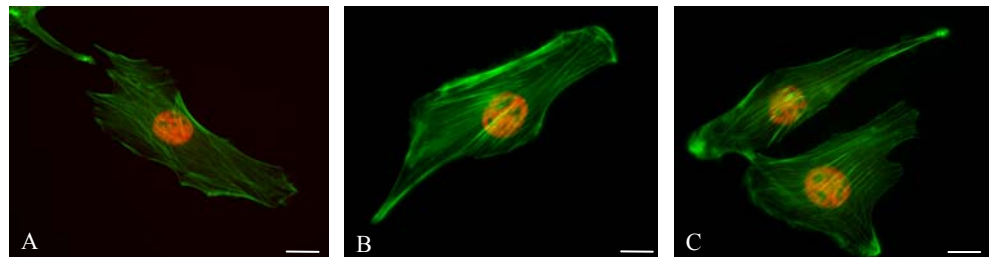


Abbildung 37: Spezifitätsnachweis der Raver1-Antikörper in C2C12-Myoblasten

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die Raver1-Antikörper erkennen in C2C12-Zellen spezifisch im Zellkern lokalisiertes, endogenes Raver1-Protein. Aktinfilamente sind mit Phalloidin-FITC gefärbt, beide Färbungen wurden übereinandergelegt. A: Raver1-Antikörper 5G6, B: Raver1-Antikörper 5D5, C: Raver1-Antikörper 7D3; Balken: 10µm

3.4.2 Lokalisation von Raver1 in Skelettmuskel

Während man aus den durchgeführten Gelfiltrationsanalysen von Zellextrakten undifferenzierter C2C12-Zellen (Kapitel 3.2.2) unter Berücksichtigung der vorliegenden Lokalisationsstudien von Raver1 in diesen Zellen (Abb. 37; Hüttelmaier et al., 2001; K. Falley) davon ausgehen kann, dass es sich bei den isolierten Komplexen um nukleäre Komponenten handelt (siehe auch Kapitel 4.2), konnte eine Assoziation mit cytoplasmatischem F-Aktin bisher nicht gezeigt werden. Eine signifikante Translokation von Raver1 aus dem Zellkern in das Cytosol ist bisher nur für Skelettmuskulatur beschrieben worden (Hüttelmaier et al., 2001). Unter Verwendung des Raver1 Antikörpers 5G6 konnten die Autoren zeigen, dass Raver1 im adulten Skelettmuskel im Sarkoplasma lokalisiert ist und hier mit α -Actinin und Vinculin kolokalisiert. Da zu jenem Zeitpunkt die Interaktion von Raver1 mit Aktin noch nicht bekannt war, wurde vermutet, dass Raver1 durch seine cytoplasmatischen Liganden in die Costamere rekrutiert wird. In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Möglichkeit einer direkten Assoziation von Raver1 mit F-Aktin im Sarkomer von Skelettmuskeln genauer analysiert werden.

Für diese Untersuchungen wurde statt des *M. soleus* der *Extensor Digitorum Longus* (EDL) verwendet, der zur schnellen Muskulatur zählt und sich aufgrund seiner Form und der parallelen Ausrichtung seiner Fasern gut für Gefrierschnitte eignet. Der Muskel wurde vor der Fixierung zudem gestreckt, wodurch die Sarkomerstrukturen verglichen mit dem ungestreckten Zustand klarer erkennbar werden. In entsprechend vorbehandeltem EDL-Muskel konnte unter Verwendung aller drei Raver1-Antikörper (Abb. 38 und Daten nicht gezeigt) eine von der Erstbeschreibung (Hüttelmaier et al., 2001) abweichende Lokalisation für Raver1 gezeigt werden. Statt einer distinkten Anfärbung der Z-Linie und der Costamere (wie in Hüttelmaier et al., 2001 dargestellt), zeigten die neu generierten Antikörper 5D5 (Abb. 38A) und 7D3 (nicht gezeigt) ebenso wie der 5G6-Antikörper (Abb. 38C) eine feine Doppelstreifung, die allerdings je nach Kontraktionszustand des Muskels und der Ausrichtung der Fasern im Schnittpräparat deutlicher oder weniger deutlich erschien. Die Spezifität dieser Signale wurde durch Kontrollansätze ohne Erstantikörper (Abb. 38G) bestätigt, die keine signifikante Färbung aufwiesen. In den jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen (Abb. 38B, F, H) war deutlich die sarkomere Streifung des Muskels zu erkennen.

Eine Gegenfärbung der Schnitte mit Phalloidin-FITC (Abb. 38E) zeigte die Lokalisation der dünnen Filamente im Muskel, wobei die zentrale Z-Linie, der Verankerungspunkt der Aktinfilamente im Muskel-Sarkomer, deutlich intensiver gefärbt war als die benachbarten Bereiche der I-Bande. Durch Übereinanderlagerung des 5G6-Signals mit der Phalloidin-färbung in Abbildung 38D wurde deutlich, dass Raver1 im Skelettmuskelgefrierschnitt nicht wie bisher beschrieben (Hüttelmaier et al., 2001) unmittelbar an der Z-Linie lokalisiert, sondern als feine Doppelstreifung in der I-Bande, angrenzend an die Z-Linie, lokalisiert. Neben dieser eindeutigen Doppelstreifung im I-Z-I-Bereich, markierten die Raver1-Antikörper auch teilweise die M-Bande (nicht gezeigt); ob es sich hierbei um eine spezifische Färbung handelt, konnte nicht abschließend geklärt werden (siehe Kapitel 4.6).

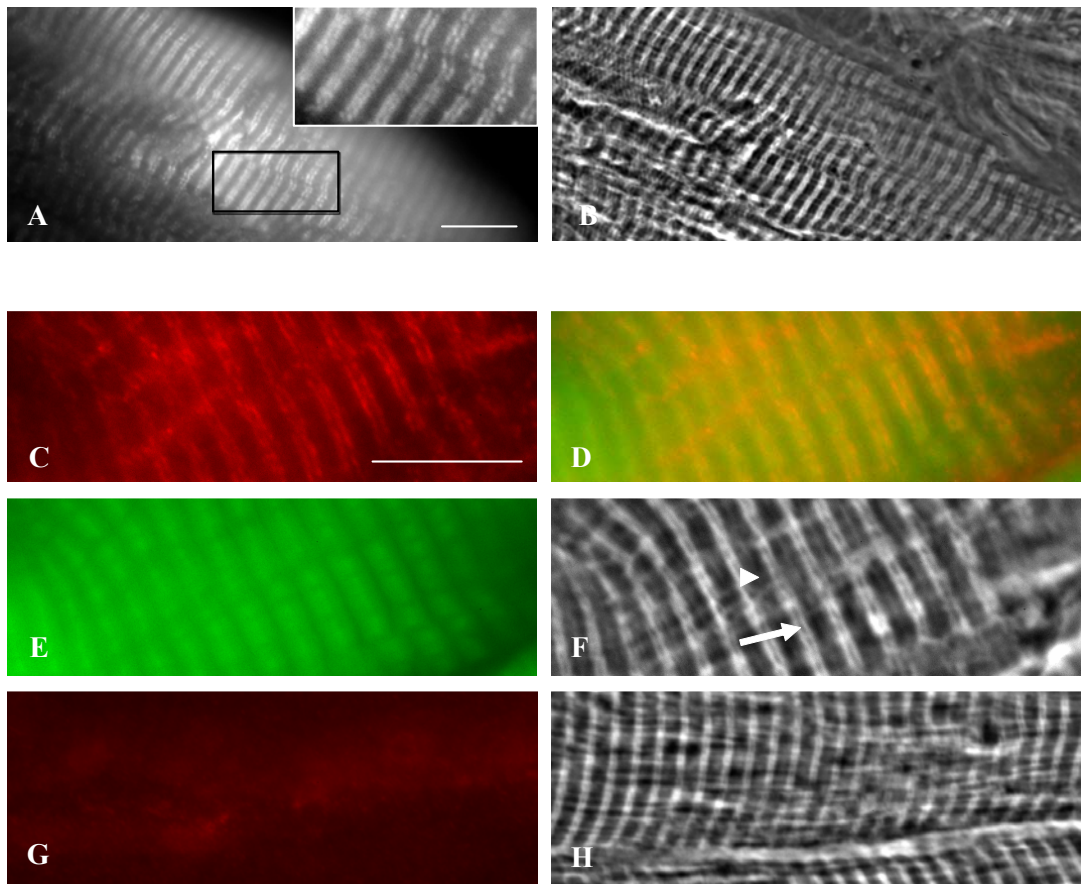


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Raver1-Lokalisation im Skelettmuskel: Raver1-Antikörper färben eine feine sarkomere Doppelbande

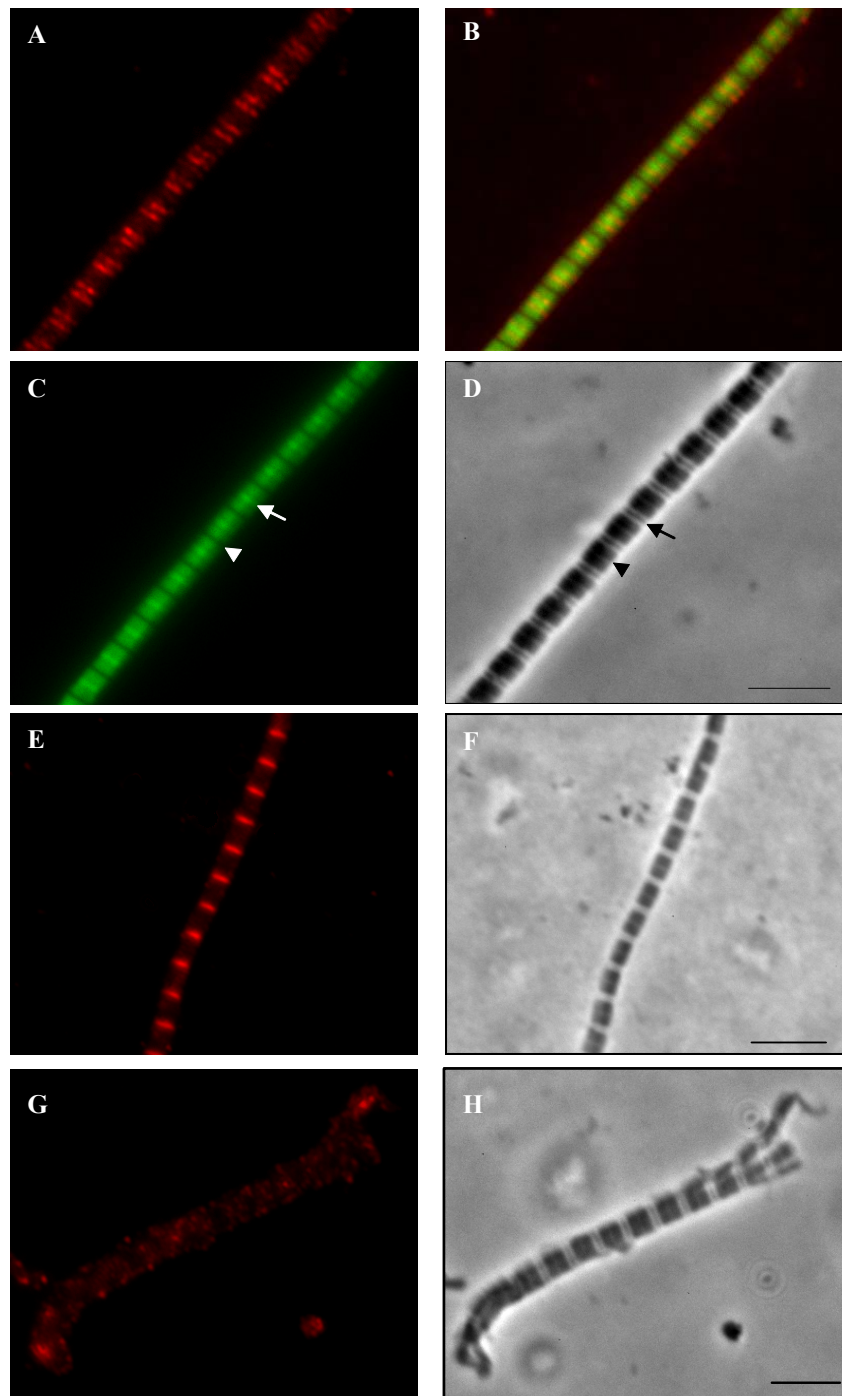
Gefrierschnitte von gestrecktem EDL-Muskel (*Extensor Digitorum Longus*) wurden mit den Raver1-Antikörpern 5D5 (A) und 5G6 (C) in der Immunfluoreszenz über einen Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (α -Maus-Cy3 1:200) analysiert. Beide Analysen weisen deutliche Doppelbanden für Raver1 auf, die nach Gegenfärbung von F-Aktin mit Phalloidin-FITC (E) und entsprechender Übereinanderlagerung (D) zu beiden Seiten der Z-Linie liegen (Pfeil). Eine Kontrolle ohne Erstantikörper (G) bestätigt die Spezifität der Raver1-Färbung. In den jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen (B, F, H) wird die sarkomere Streifung deutlich. Hervorgehoben sind die I-Bande, in deren Mitte sich die dunkel gefärbte Z-Linie befindet (Pfeil) und die A-Bande (Pfeilkopf). Balken: 10 μ M

Die auf Skelettmuskelgefrierschnitten gezeigte Lokalisation von Raver1 als Doppelstreifung in der I-Z-I-Region war leider in konfokalen Aufnahmen nicht zufriedenstellend darstellbar. Eine Unterscheidung, ob Raver1 ähnlich wie Vinculin lediglich in der Peripherie des Muskels lokalisiert ist (Koteliansky & Gneushev, 1983; Pardo et al., 1983) oder mit α -Actinin und Aktin ein integraler Bestandteil des Sarkomers ist, konnte somit anhand der Schnittpräparate nicht geklärt werden. Es wurden daher Myofibrillen aus Skelettmuskel wie in Kapitel 2.2.4.1. beschrieben präpariert, da diese nur „nackte“ Fibrillen aber kein Sarkolemma und somit keine Costamere mehr enthalten.

Auch bei der Analyse der Myofibrillen ergab die Färbung mit Raver1-spezifischen Antikörpern ein gestreiftes Muster (Abb. 39A), das dem der Schnittpräparate entsprach. Eine Gegenfärbung von Aktin mittels Phalloidin-FITC (Abb. 39C) zeigte deutlich die I-Banden-Region der Myofibrillen, die in der Phasenkontrastaufnahme (Abb. 39D) als helle Bande mit zentraler, dunkler Z-Linie, erschien. In der Übereinanderlagerung beider Färbungen lokalisierte Raver1 in der I-Bande in enger Nähe zur Z-Linie (Abb. 39B).

Eine Färbung von α -Actinin mittels spezifischem Antikörper zeigte erwartungsgemäß ein deutliches Signal der Z-Linie (Abb. 39E), welches sich im Muster eindeutig von der mit dem Raver1 angefärbten Doppelbande unterschied. In Abbildung 39F ist die zugehörige Durchlichtaufnahme dargestellt. Eine direkte Doppelfärbung mit den Raver1-Antikörpern war nicht möglich, da auch der α -Actinin-Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist. Während α -Actinin eine integrale Komponente der Z-Linie ist und somit in Myofibrillen gut darstellbar ist, ist Vinculin in seiner Lokalisation auf die peripheren Costamere beschränkt, die den isolierten Myofibrillen aufgrund der Isolationsmethode fehlen. Bei Verwendung eines Vinculin-Antikörpers konnte somit lediglich ein schwaches, diffuses Signal beobachtet werden, welches als Hintergrundfärbung zu deuten ist, da es der Negativkontrolle ohne Erstantikörper entsprach (nicht gezeigt). Dies spricht zudem für die Spezifität der Raver1 und α -Actinin-Färbungen.

Diese Experimente weisen Raver1 eindeutig als integrale Komponente der I-Bande aus; eine direkte Wechselwirkung mit Aktin wäre in diesem Bereich durchaus denkbar.



Isolierte Skelettmuskelfibrillen wurden mit dem Raver1-Antikörper 5G6 und einem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (Cy3, 1:200) (A) bzw. Phalloidin-FITC (C) gefärbt. Die Überlagerung beider Bilder (B) und der Vergleich mit der Phasenkontrastaufnahme (D) zeigt deutlich die Lokalisation von Raver1 als Doppelstreifen in der I-Bande. (E) zeigt eine Färbung von α -Actinin in der Z-Linie, in (F) ist die entsprechende Phasenkontrastaufnahme abgebildet. In (G) ist eine Färbung mit einem Vinculin-Antikörper (hVin1) dargestellt, die als Kontrolle dient, (H) zeigt die zugehörige Phasenkontrastaufnahme. Der Pfeil deutet auf die helle I-Bande, in deren Mitte sich die dunkel gefärbte Z-Linie befindet, die Spitze des Dreiecks markiert die A-Bande. Balken: 5 μ m

Auch auf ultrastruktureller Ebene konnte die Assoziation von Raver1 mit der I-Bande dargestellt werden. Immunogold-Analysen an muriner Skelettmuskulatur wurden freundlicherweise von Cora-Ann Schönenberger und Ulrich Schröder (M. Müller Institut, Biozentrum, Basel, Schweiz) mit allen drei Raver1-Antikörpern und einem Gold-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt (Abb. 40). Da jeweils identische Markierungen erzielt wurden, ist in Abbildung 40 eine repräsentative, mit dem 7D3 erzielte Aufnahme abgebildet. Zur besseren Darstellung wurden die Goldkörner rot hervorgehoben. Diese Analysen bestätigen nicht nur, dass Raver1 in der zentralen Region der I-Bande, in direkter Nähe zur Z-Linie lokalisiert, sondern lassen auch eine direkte Bindung an sarkomeres Aktin wahrscheinlich erscheinen. Eine zusätzliche Rekrutierung über α -Actinin oder Vinculin kann aber nicht ausgeschlossen werden.

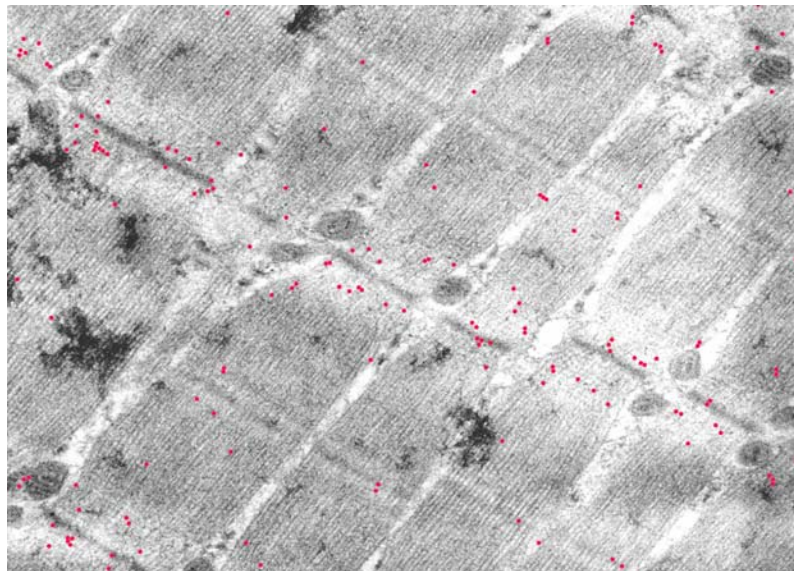


Abbildung 40: Immuno-Elektronenmikroskopie mit einem Raver1-spezifischen Antikörper

Schnitte muriner Skelettmuskulatur wurden mit dem Raver1-spezifischen Antikörper 7D3 und einem Gold-gekoppelten Zweitantikörper markiert. Die Goldkörner wurden zur Verdeutlichung rot abgebildet. Raver1 lokalisiert in der I-Z-I-Region. (Daten zur Verfügung gestellt von C.-A. Schönenberger und U. Schröder, M. Müller Institut, Biozentrum, Basel, Schweiz.)

3.4.3 Lokalisation von Raver1 in Herzmuskel und glatter Muskulatur

Bisherige Lokalisationsstudien waren nur an Skelettmuskulatur durchgeführt worden. Diese Analysen sollten auf Herzmuskelgewebe und glatte Muskulatur ausgeweitet werden, um zu überprüfen, ob die nucleo-cytoplasmatische Translokation von Raver1 ein generelles Phänomen differenzierter Muskulatur ist.

Bei der Verwendung der Raver1-Antikörper 5D5, 7D3 und 5G6 wurden an Gefrierschnitten muriner Herzen identische Signale erzielt, daher sind in Abbildung 41 exemplarisch die mit dem Raver1-Antikörper 5G6 erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Die Querstreifung des kontraktiles Apparates der Cardiocyten und die Glanzstreifen, durch welche die einzelnen Herzmuskelzellen miteinander verknüpft sind, waren bereits in der Phasenkontrastaufnahme (Abb. 41C, G) erkennbar. Auch in Herzmuskelzellen wurden durch alle Raver1-Antikörper Doppelbanden nachgewiesen, die nach Gegenfärbung der Aktinfilamente mit Phalloidin –FITC in der I-Bande lokalisiert ist und somit dem Verteilungsmuster von Raver1 in Skelettmuskelschnitten entspricht. Diese Doppelbanden konnten nur bei sehr dünnen Gefrierschnitten gut aufgelöst werden, so dass die Gewebeintegrität der Schnitte nicht immer vollständig erhalten werden konnte. Darüber hinaus wurden auch die Glanzstreifen benachbarter Herzmuskelzellen erkannt. Eine unspezifische Färbung konnte mittels einer Kontrolle ohne Verwendung des Erst-Antikörpers ausgeschlossen werden (Abb. 41H).

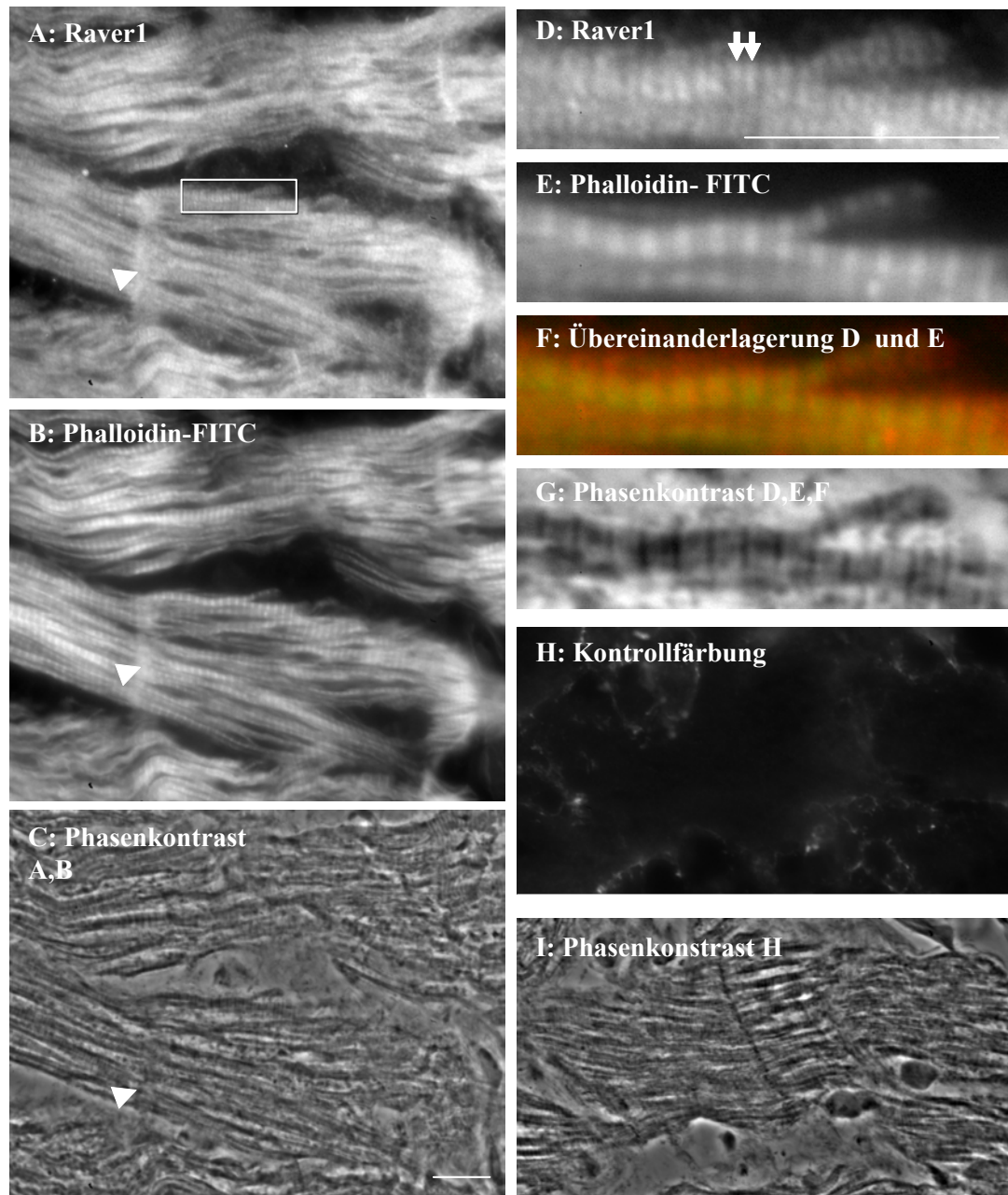


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Raver1-Lokalisation im Herzmuskel

Gefrierschnitte (5µm) des Herzmuskels gefärbt mit dem Raver1-Antikörper 5G6 (A) und Phalloidin-FITC (B). (C) zeigt die entsprechende Phasenkontrastaufnahme, in der die Querstreifung der Herzmuskulatur sichtbar ist. Die Pfeilköpfe markieren jeweils einen Glanzstreifen. (D-G) Ausschnittsvergrößerung des in (A) markierten Bereichs. Die Raver1-Färbung zeigt deutlich die durch die Pfeile hervorgehobene Doppelbande, die nach Gegenfärbung mit Phalloidin-FITC (E) und entsprechender Übereinanderlagerung und Vergleich mit der Phasenkontrastaufnahme (G) beidseitig der Z-Linie lokalisiert ist. (H) wurde als Kontrolle nur mit dem Zweitantikörper (Cy3) gefärbt, (I) zeigt die zugehörige Phasenkontrastaufnahme. Der Raver1-Antikörper färbt deutlich die I-Bande sowie die Glanzstreifen. Balken: 10 µm

Die Darstellung der Raver1-Lokalisation im Glattmuskel erfolgte exemplarisch an Gefrierschnitten muriner Harnblasen. Auch in diesem Muskeltyp ergab sich ein einheitliches Bild für alle Raver1-Antikörper und ist für den 5G6 dargestellt (Abb. 42A). Die starke Aktin-Phalloidin-Färbung in Abbildung 42 weist die Glattmuskelbereiche des Schnittes auf, deren kontraktile Elemente im Gegensatz zum Skelett- oder Herzmuskel nicht in Sarkomere unterteilt sind, sondern die eine lockere Anordnung der Myofibrillen aufweisen. An die Glattmuskelbereiche des Schnittes grenzen Bindegewebsstrukturen an, die in der Phasenkontrastaufnahme zu erkennen sind (Abb. 42D). Die Grenze beider Gewebeschichten ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben. Im Gegensatz zur typischen Kernlokalisierung von Raver1 in Fibroblasten, die durch eine entsprechende Gegenfärbung (DAPI) bestätigt wurde, ist Raver1 auch in glatter Muskulatur ein sarkoplasmatischer Bestandteil. Eine genauere Lokalisation war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Um auszuschließen, dass es sich bei den Signalen um eine unspezifische Färbung handelt, wurden als Kontrolle Schnitte ohne Raver1-Antikörper angefertigt. Diese Färbungen zeigten kein spezifisches Signal (Abb. 42E).

Neben der bisher für Skelett- und Herzmuskelgewebe beschriebenen Translokation von Raver1 aus dem Zellkern ins Cytoplasma, kann diese Beobachtung auch für Glattmuskelgewebeschnitte bestätigt werden. Die Translokation von Raver1 scheint damit ein generelles Muskelphänomen zu sein, welches mit muskulären Differenzierungsprozessen verbunden sein könnte.

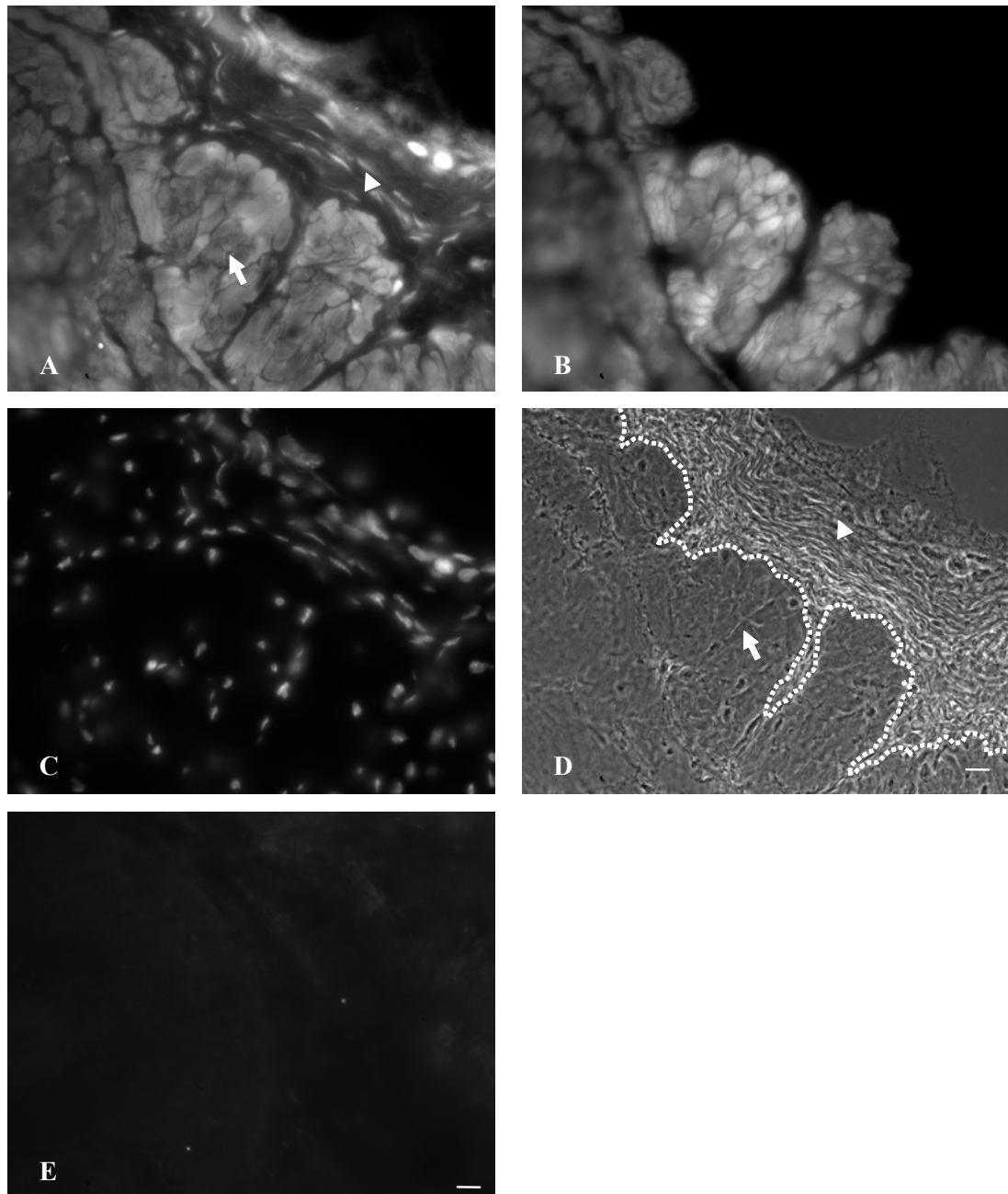


Abbildung 42: Raver1-Lokalisation auf Blasengewebe

Gefrierschnitte gefärbt mit dem Raver1-Antikörper 5G6 und einem Fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (A) sowie Phalloidin-FITC (B). Eine DAPI –Färbung (C). verdeutlicht die Lage der Zellkerne. D zeigt die Phasenkontrastaufnahme. E wurde zur Kontrolle nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Raver1 zeigt im Glattmuskel eine cytoplasmatische, im Bindegewebe hingegen eine ausschließlich nukleäre Lokalisation. Der Pfeil deutet auf die Glattmuskelbereiche des Schnittes, der Pfeilkopt markiert Bindegewebsbereiche, beide Bereiche wurden zur Verdeutlichung durch eine gestrichelte Linie voneinander getrennt. Balken: 20µm

4 Diskussion

Raver1 wurde 2001 als ein neues "dual compartment" Protein identifiziert, das aufgrund seiner Sequenzhomologie zu der Familie der hnRNP-Proteine zu zählen ist. Raver1 wird ubiquitär exprimiert und ist in den meisten bis heute untersuchten Geweben im Zellkern lokalisiert, obwohl das Protein prinzipiell in der Lage ist, zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln. Nur in Muskelzellen (Hüttelmaier et al., 2001 und diese Arbeit) und in epithelialen MDCK-Zellen (D. Fleckenstein und S. Illenberger, unveröffentlicht) kommt es zu einer signifikanten Translokation ins Cytoplasma, die möglicherweise an Differenzierungsprozesse gekoppelt ist. Über die genaue Funktion von Raver1 in beiden Kompartimenten ist bisher wenig bekannt. Gromak et al. lieferten 2003 Hinweise auf eine Beteiligung von Raver1 an PTB-vermittelten Spleiß-Vorgängen (Gromak et al., 2003) und somit auf eine mögliche Kernfunktion von Raver1. Konkrete Anhaltspunkte für eine cytoplasmatische Funktion von Raver1 konnten bisher nicht gefunden werden. Die beschriebene Interaktion mit Vinculin, Metavinculin und α -Actinin deutet jedoch auf eine mögliche strukturelle oder regulative Beteiligung von Raver1 an zellulären Adhärenzverbindungen hin (Jockusch et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Aufreinigung rekombinanten Raver1-Proteins etabliert. Die Interaktion mit den bisher bekannten Raver1-Bindungspartnern konnte dabei biochemisch verifiziert und charakterisiert werden (Kapitel 3.1). Die Identifizierung von Aktin als neuen Liganden (Kapitel 3.2) sowie die Analyse möglicher Regulationsmechanismen (Kapitel 3.3), haben weitere Aspekte bezüglich der zellulären Funktion von Raver1 gebracht.

4.1 Die biochemische Charakterisierung von Raver1

Ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der Expression und Aufreinigung rekombinanten Gesamt-Raver1-Proteins und zweier Raver1-Deletionskonstrukte. Anhand dieser rekombinanten Proteine sollte zum einen analysiert werden, ob Raver1 direkt an die bisher identifizierten potentiellen Liganden Vinculin, Metavinculin, α -Actinin und PTB bindet. Desweiteren sollten erste Untersuchungen zu möglichen Regulationsmechanismen der Ligandenbindung von Raver1 durchgeführt werden.

Die Herstellung rekombinanten Raver1-Proteins erwies sich anfangs als schwierig und die zunächst verwendeten bakteriellen Expressionssysteme als ungeeignet, denn in allen getesteten Systemen konnte keine oder lediglich eine niedrige Expression mit starker proteolytischer Degradation des Proteins erzielt werden. Auch durch die Veränderung verschiedener Expressionsparameter, wie die Temperatur oder die Verwendung von *E.coli*-Stämmen mit optimierter "codon usage" konnte die Ausbeute an Raver1 nicht verbessert werden (Kapitel 3.1.1). Ein generelles Problem bakterieller Expression ist, dass Bakterien keine posttranslationalen Modifikationen, welche häufig für die Faltung und Funktion eukaryotischer Proteine erforderlich sind, ausführen können. Misgefaltete, biologisch

inaktive, rekombinante Proteine werden von Bakterien in sogenannten "inclusion bodies" eingelagert oder werden von Proteasen degradiert (Villaverde & Carrió, 2003). Molekulare Chaperone unterstützen die Proteinfaltung und könnten ebenso für die Faltung von rekombinanten Raver1 benötigt werden. Durch Koexpression individueller Chaperone kann in Bakterien die Faltung unterstützt werden; die Auswahl der geeigneten Chaperone ist jedoch willkürlich und kann im Falle der Wahl eines ungeeigneten Chaperons die Stabilität des rekombinanten Proteins negativ beeinflussen (Hoffmann & Rinas, 2004). Die Verwendung des Bac-to-Bac™-Systems, in welchem die Proteinexpression in Insektenzellen erfolgt, die ähnlich höherer eukaryotischer Zellen rekombinante Proteine korrekt falten und modifizieren können, ermöglichte schließlich die Expression von Raver1. Jedoch wies auch in diesen Zellen das rekombinante Raver1-Protein eine deutliche Proteolyse auf und zeigte, wie „light scattering“-Versuche erkennen ließen, eine Tendenz zur Aggregation (nicht gezeigt). Insgesamt konnte dennoch genügend reines und lösliches Protein isoliert werden, so dass biochemische Analysen möglich waren. Kurze Expressionszeiten minderten die Degradation und erlaubten zumindest eine Proteinausbeute von 1 mg Gesamt-Raver1, 3,5 mg Raver1 Δ N und 3,5 mg Raver1 Δ C aus $1,5 \times 10^8$ Insektenzellen.

4.1.1 Nachweis einer direkten Interaktion mit bekannten Liganden

Die etablierte Aufreinigung rekombinanter Raver1-Konstrukte ermöglichte erstmals die biochemische Verifizierung einer direkten Wechselwirkung von Raver1 mit den Liganden Vinculin, Metavinculin, α -Actinin und PTB (Kapitel 3.1.2); bisher konnte eine indirekte Bindung von Raver1 an diese Liganden als Bestandteil von Multiproteinkomplexen nicht ausgeschlossen werden.

Die anhand von „Yeast Two-Hybrid“-Analysen beschriebene Vinculin- und Metavinculin-Bindungsregion im N-Terminus von Raver1 (Hüttelmaier et al., 2001) konnte mit dem rekombinanten Deletionskonstrukt Raver1 Δ C ebenso biochemisch bestätigt werden wie die Beobachtung einer stärkeren Raver1 Interaktion mit MVT als mit VT. Somit handelt es sich bei Raver1 um das erste Protein, für welches ein divergentes Bindungsverhalten für Vinculin und Metavinculin festgestellt werden konnte. Metavinculin ist eine muskelspezifische Spleißvariante von Vinculin und interessanterweise zeigt Raver1 gerade in Muskelgewebe eine Translokation vom Zellkern ins Cytoplasma. Da die Translokation in Muskelzellen differenzierungsabhängig erfolgt (Hüttelmaier et al., 2001, und Kapitel 4.3) und möglicherweise mit der beginnenden Expression von Metavinculin korreliert ist, könnten diese beiden Prozesse durchaus in einer kausalen Beziehung stehen. Zum einen könnte Raver1 als hnRNP-Protein an der Translokation der Metavinculin mRNA beteiligt sein, oder als direkter Bindungspartner die molekulare Architektur muskulärer Adhärenzverbindungen beeinflussen (Kapitel 4.5).

Die Anwesenheit von Phospholipiden verstärkt die Interaktion von Raver1 sowohl mit MVT als auch mit VT in ELISA- und "crosslink"- Experimenten. Auch in der Erstbeschreibung wurde die verstärkte Bindung von Raver1 an Vinculin und Metavinculin in Overlay-Experimenten nach Präinkubation der

Proteine mit PIP₂ beobachtet. Während dort jedoch die verstärkte Bindung auf die Entfaltung der intermolekularen Interaktion von Vinculin und Metavinculin durch PIP₂ zurückgeführt wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Raver1 auch direkt an Phospholipide, darunter PIP₂, bindet (Kapitel 3.3.1). Eine mögliche Regulation wird in Kapitel 4.2 diskutiert. Ob somit die stärkere Raver1 Bindung an Vinculin und Metavinculin auf eine Konformationsänderung der Proteine und somit eine bessere Zugänglichkeit der Bindungsdomäne(n), oder lediglich auf die gleichzeitige, direkte Bindung von Raver1 und seinen Liganden an PIP₂ zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Auch die Interaktion mit α -Actinin konnte in ELISA-, „chemical crosslink“- und „Spot-Overlay“-Experimenten biochemisch verifiziert werden. Die Bindung an α -Actinin erfolgt über den C-Terminus (AS 442-748) von Raver1 und wird, wie „Spot-Overlay“-Experimente zeigen, im Gegensatz zur Vinculin/Metavinculin-Bindung nicht durch PIP₂ modifiziert. Dies ist zudem ein indirekter Hinweis darauf, dass die stärkere Assoziation von Raver1 mit beiden Vinculin-Isoformen in Anwesenheit von PIP₂ eher auf eine bessere Zugänglichkeit der Bindungsbereiche zurückzuführen ist, da sonst auch bei den Interaktionsstudien zwischen Raver1 und dem ebenfalls PIP₂-bindenden α -Actinin ein ähnlicher Effekt hätte beobachtet werden müssen.

Durch die biochemischen Analysen konnte schließlich auch die physische Interaktion von Raver1 mit seinem zu Beginn der Arbeit einzigen kernständigen Liganden PTB gezeigt werden. Die Bindung wird vom N-terminalen, die RRM_s enthaltenden, Raver1-Bereich vermittelt (AS 1-441). Für PTB konnte gezeigt werden, dass im allgemeinen RRM₂ für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen benötigt wird (Kamath et al., 2001). Möglicherweise sind auch die im N-Terminus von Raver1 enthaltenen RRM_s für Proteininteraktionen notwendig. Allerdings konnten Gromak et al. in GST-Pulldown-Experimenten die Bindungsregion auf die Aminosäuren 307-401 von Raver1, welche nicht die RRM_s beinhalten, einschränken (Gromak et al., 2003). Diese Versuche wurden jedoch mit *in vitro* translatiertem Raver1-Protein durchgeführt, wodurch eine indirekte Raver1-PTB-Interaktion wiederum nicht ausgeschlossen werden kann. Durch die bereits beschriebenen Expressionseinschränkungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine weiteren rekombinanten Raver1-Fragmente hergestellt werden, um den Bindungsbereich für PTB näher einzugrenzen. Auf eine mögliche Funktion der Raver1-PTB-Interaktion wird in Kapitel 4.5 eingegangen.

4.2 Raver1 ist ein Aktin-bindendes Protein:

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit, war kein Bindeglied bekannt, welches eine mögliche Verknüpfung von Kernfunktion und cytoplasmatischer Lokalisation von Raver1 dargestellt hätte. In „Yeast Two-Hybrid“-Analysen (Kapitel 3.2) konnte mit Aktin erstmalig ein potentieller Raver1-Ligand identifiziert werden, für den eine Raver1-Interaktion sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern denkbar ist (Kapitel 1.1.1.2).

4.2.1 Die Interaktion von Raver1 mit verschiedenen Aktinkonformationen wird über die C-terminale Region vermittelt

In vitro konnte insgesamt eine Bindung von Raver1 an monomeres G-Aktin, Aktinfilamente (F-Aktin) sowie an dimeres „lower dimer“ Aktin (LD-Aktin) in ELISA-Experimenten gezeigt werden. Bei den Aktindimeren unterscheidet man „upper-“ und „lower dimer“ (LD-Aktin), die beide aus zwei verknüpften G-Aktin-Untereinheiten gebildet werden, sich jedoch in der Lage der Aktinuntereinheiten zueinander unterscheiden (Millonig et al., 1988; Steinmetz et al., 1997). Overlay-Experimente mit *in vitro* translatiertem Raver1-Protein bestätigen die Bindung an immobilisiertes F-Aktin, eine G-Aktin-Bindung war hier nicht nachweisbar, konnte aber in „chemical crosslink“ Experimenten gezeigt werden. Für diese „crosslink“ Experiment wurde ECP-Aktin eingesetzt, ein mit der *E.coli*-A2-Protease ECP32 behandeltes Aktin, welches seine native Konformation beibehält, jedoch in Gegenwart von Calcium-Ionen nicht mehr polymerisiert und somit in einer G-Aktin-Konformation vorliegt (Khaitlina et al., 1991; Khaitlina et al., 1993). *In vitro* konnte somit die Interaktion von Raver1 mit allen hier untersuchten Aktin-Konformationen gezeigt werden, auch wenn nicht jede dieser Assoziationen in allen Assays nachweisbar war.

ELISA-Daten zeigen, dass die Raver1-Aktin-Interaktion primär über den C-Terminus von Raver1 vermittelt wird, der sowohl G- als auch F-Aktin in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen bindet. Die F-Aktin-Bindung wurde dabei *in vitro* noch näher charakterisiert, Kosedimentationsstudien mit dem rekombinanten Gesamt-Raver1-Protein und dem rekombinanten C-Terminus zeigen, dass es sich bei Raver1 nicht nur um ein Aktin-bindendes sondern auch -bündelndes Protein handelt. Solche *in vitro* Aktin-Bündelungseigenschaften sind ein Charakteristikum vieler Aktin-bindender Proteine (Ruzanov et al., 1999; Mulder et al., 2003). Dieser Aktinbündelung könnten zwei Mechanismen zugrunde liegen: Raver1 könnte zwei Aktin-bindende Bereiche enthalten oder die Fähigkeit zur Selbstassoziation besitzen. Bisher konnten „Crosslink“-Experimente unter Verwendung des Gesamtproteins zwar keine Hinweise auf eine Dimerisierung oder Oligomerisierung von Raver1 liefern, doch das rekombinante N-terminale-Fragment ist durchaus in der Lage, mit sich selbst zu assoziieren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Raver1-Moleküle erst aktiviert werden müssen oder eine Dimerisierung durch die Bindung von Aktin induziert wird. Ein solcher Mechanismus konnte für VT und MVT gezeigt werden (Johnson & Craig; 2000, Witt et al., 2004). Denkbar ist auch, dass sich im Raver1-C-Terminus zwei Aktinbindungsregionen befinden, denn dieser Bereich alleine genommen zeigt ebenfalls Aktinbündelungseigenschaften, obwohl für diese Fragment nach „crosslink“ Experimenten eine Dimerisierung ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren kann auch eine Aktinbindungsregion im N-Terminus von Raver1 nicht definitiv ausgeschlossen werden. Dieser Bereich bindet Aktin in den bisher durchgeführten Versuchen zwar deutlich schlechter, eine prinzipielle Interaktion war jedoch im ELISA nachweisbar.

Die Raver1-Primärsequenz zeigt keine offensichtlichen Ähnlichkeiten zu bekannten Aktin-Bindungsdomänen wie beispielsweise Calponin-Homologie- oder ADF-H („actin depolymerizing

factor homology")- Domänen (Stradal et al., 1998; Lappalainen et al., 1998). Daher kann Raver1 nicht in eine klassische Gruppe Aktin-bindender Proteine eingegliedert werden. Die Aminosäuresequenz enthält jedoch basische Regionen im C-Terminus, welche die Aktin-Interaktion vermitteln könnten.

Viele Aktin-assoziierte Proteine werden in ihrer Funktion durch das saure Phospholipid PIP₂ beeinflusst (Sechi & Wehland, 2000). Tatsächlich waren die ersten Proteine, für die eine Regulation durch Phospholipide beschrieben wurde, cytoskelettale Proteine (Lassing & Lindberg, 1985). Die Liste der durch Phospholipide, gewöhnlich durch PIP₂, regulierten Aktin-bindenden Proteine hat sich seitdem sehr verlängert (Sechi & Wehland, 2000) und auch viele nicht Aktin-bindende PIP₂-Liganden sind inzwischen hinzugekommen. Viele dieser Liganden konnten zunächst aufgrund ihrer PH, FYVE oder anderer PIP₂-Bindungsmotive identifiziert werden, ihr Lipidbindungspotential wurde erst nach der Identifizierung experimentell bestätigt. (Yin & Janmey, 2003). Konträr hierzu wurden die meisten cytoskelettalen, Phosphoinositid-bindenden Proteine zunächst biochemisch identifiziert und die spezifischen Lipidbindungsstellen erst danach eingegrenzt. Die Struktur der Phosphoinositid-Bindungsstellen cytoskelettaler Proteine ist zumeist weniger gut charakterisiert als die bereits erwähnten PH- und FYVE-Motive (Yin & Janmey, 2003). Generell fördert PIP₂ die Aktin-Dynamik sowie die Interaktion mit der Plasmamembran, indem es die Dissoziation Aktin-Monomer-bindender Proteine von G-Aktin und von „capping“-Proteine vom schnell polymerisierenden Plus-Ende der Aktinfilamente fördert (Sechi und Wehland, 2000). PIP₂ hat somit Einfluss sowohl auf G- als auch auf F-Aktin-bindende Proteine. Beispielsweise wird Aktin nach PIP₂-Bindung an Profilin aus dem Profil-Aktin-Komplex entlassen und steht als freies G-Aktin für die Aktinpolymerisation zur Verfügung (Lassing & Lindberg, 1985.). Das „capping“-Protein CapG wird durch PIP₂ in seiner F-Aktin-Bindung ebenso inhibiert wie das Aktinfilamente bündelnde Protein α -Actinin (Yu et al., 1990; Fraley et al., 2003). Auch auf Vinculin hat PIP₂ einen zumindest unterstützenden regulatorischen Einfluss; das Vinculinmolekül wird durch PIP₂ in eine aktive Konformation überführt, in der Ligandenbindungsstellen besser zugänglich sind (Kapitel 1.2.2.2, Gilmore & Burridge, 1996). Da jedoch die PIP₂- und Aktinbindungsdomänen im Vinculinmolekül überlappen, ist die simultane Bindung beider Liganden an Vinculin ausgeschlossen; es kommt zu einer kompetitiven Hemmung der F-Aktin-Bindung durch PIP₂ (Steimle et al., 1999). Neue Studien zeigen, dass Vinculin als Sensor lokaler PIP₂-Spiegel im Bereich von Adhärenzverbindungen dienen kann (Chandrasekar et al., 2005). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wird auch die Interaktion von Raver1 mit Aktin *in vitro* durch PIP₂ modifiziert. Die Bindung von PIP₂ an Raver1 wirkt sich negativ auf die Raver1-Aktin-Assoziation aus. Es ist durchaus vorstellbar, dass dieser Effekt, ähnlich wie für Vinculin beschrieben, auf überlappende Bindungsregionen der Moleküle im Raver1-Protein zurückzuführen ist. Die genauen PIP₂-Bindungsregionen im Raver1 Molekül konnten bisher nicht eingegrenzt werden. Sowohl das rekombinant N-terminale als auch das C-terminale-Fragment zeigen eine Interaktion mit PIP₂, wobei die Bindung im C-Terminus etwas stärker ist. Raver1 reiht sich somit in die Liste der durch PIP₂ regulierten Aktin-bindenden Proteine ein.

4.2.2 Die Assoziation von Raver1 mit Aktin kann sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma erfolgen

Die biochemischen Analysen belegen, dass Raver1 mit verschiedenen Aktinkonformationen interagieren kann. Sie geben aber keinen Aufschluss darüber, in welchem zellulären Kompartiment diese Interaktionen stattfinden. Es ist durchaus denkbar, dass Raver1 in Cytoplasma und Kern mit unterschiedlichen Aktinkonformationen interagiert.

Entgegen früheren Meinungen ist Aktin ein natürlicher und wichtiger Bestandteil des Zellkerns. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von Aktin an verschiedenen Kernprozessen, wie Transkription, mRNA-Export und Chromatin-„remodelling“ (Bettinger et al., 2004). Die genaue Konformation von Aktin im Zellkern ist bisher unbekannt, muss sich jedoch grundlegend von der des cytoplasmatisch lokalisierten Aktins unterscheiden, da Kernaktin von Phalloidin nicht markiert wird (Pederson & Aebi, 2002; Bettinger et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass Aktin entweder in monomerer Form, oder in einer bisher unbekannten oligomeren Struktur im Zellkern vorliegt.

Erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion von Raver1 mit Kernaktin konnten aus den Gelfiltrationsanalysen von Zellextrakten undifferenzierter C2C12-Zellen gewonnen werden, bei denen Raver1-haltige Komplexe isoliert werden konnten, in denen gleichzeitig Aktin und PTB enthalten waren. Raver1 und PTB lokalisieren in diesen Zellen primär im Zellkern (Hüttelmaier et al., 2001). Über die Bindung an PTB könnte Raver1 in diesen Kern-Komplexen an der mRNA Prozessierung oder deren Transport beteiligt sein. In Assoziation mit Aktin wäre außerdem eine Beteiligung an Transkriptionsprozessen denkbar (Abb. 43). In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus erstmalig eine Assoziation mit Aktinfilamenten im Bereich der I-Bande gestreifter Muskulatur nachgewiesen werden. Frühere Analysen hatten eine cytoplasmatische Lokalisation für Raver1 in den Fokalkontakten der fibroblastischen Zelllinie SV80 beschrieben sowie einen verstärkten Export aus dem Kern in differenzierenden C2C12-Zellen. In Skelettmuskeln wurde eine Kolo-kalisation mit α -Actinin und Vinculin gezeigt (Hüttelmaier et al., 2001). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden diese Daten dahingehend interpretiert, dass Raver1 über seine Liganden Vinculin und α -Actinin in diese cytoplasmatischen Strukturen rekrutiert wird. Aufgrund der aktuellen Datenlage kann jedoch auch eine direkte Aktinbindung in diesen Strukturen nicht mehr ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Raver1 nicht auf periphere Costamere im Skelettmuskel beschränkt ist. Die Untersuchungen an isolierten Myofibrillen und Schnittpräparaten gestreifter Muskulatur weisen eindeutig auf eine Lokalisation von Raver1 in der I-Bande, in unmittelbarer Nähe der Z-Linie auf. Diese Befunde werden auch durch Immunogold-Analysen untermauert. Möglicherweise interagiert Raver1 im Bereich der I-Bande mit Aktin; die Aktinfilamente überlappen in der I-Bande nicht wie in der Region der A-Bande mit Myosin-Filamenten und sind somit räumlich für andere Liganden besser zugänglich. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Assoziation von Raver1 mit der I-Bande nicht in früheren Untersuchungen beobachtet wurde (Hüttelmaier et al., 2001), könnte darin bestehen, dass die I-Bande nur im relaxierten Muskel von der Z-Bande unterschieden

werden kann. So ist beispielsweise auch in isolierten Cardiomyocyten nach Standardfixierung keine Auflösung der Z- und I-Bande möglich (E. Ehler, pers. Kommunikation).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lokalisationsstudien erstmals auf Herz- und Glattmuskel ausgeweitet. Auch im Herzmuskel zeigt Raver1 eine zum Skelettmuskel analoge Lokalisation als feiner Doppelstreifen zu beiden Seiten der Z-Linie im Bereich der I-Bande. Darüber hinaus zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ein zusätzlich ein deutliches Signal in den Glanzstreifen benachbarter Herzmuskelzellen. Hierbei handelt es sich um spezialisierte Bereiche, in denen verschiedene Arten der Zell-Zell-Kontakte ("Gap Junctions", Adhärenzverbindungen und Desmosomen) zwischen den Herzmuskelzellen ausgebildet werden, um die interzelluläre Kommunikation, die mechanische Integration und die Kraftübertragung zwischen den Zellen zu gewährleisten und somit die optimale Herzkontraktion sicherzustellen (Perriard et al., 2003). Durch die lediglich fluoreszenzmikroskopisch beobachtete Lokalisation von Raver1 in den Glanzstreifen kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, mit welchem Typ der Zell-Zell-Kontakte Raver1 hier assoziiert. Da allerdings der Raver1-Bindungspartner Vinculin in Cadherin-vermittelte Adhärenzverbindungen eingebunden ist (Pardo et al., 1983), kann über eine Bindung von Raver1 an diese Strukturen spekuliert werden. In der glatten Muskulatur zeigt sich ebenfalls eine cytoplasmatische Lokalisation des Proteins. Im Gegensatz zu seinen Liganden Vinculin und Metavinculin (Belkin et al., 1988) ist Raver1 hier nicht auf die "dense plaques", die Adhärenzverbindungen der Glattmuskelzellen, beschränkt, sondern zeigt eine einheitliche Färbung des Cytoplasmas. In allen drei Muskeltypen konnte somit eine cytoplasmatische Lokalisation von Raver1 gezeigt werden. Im Gegensatz zu ausdifferenziertem Muskelgewebe ist Raver1 in undifferenzierten Myoblasten und embryonalen Cardiomyocyten (unveröffentlichte Daten, Kooperation mit E. Ehler, King's College, London) vorwiegend im Kern lokalisiert, so dass davon auszugehen ist, dass die cytoplasmatische Akkumulation von Raver1 die Folge einer regulierten Translokation aus dem Kern während der Muskeldifferenzierung ist.

4.3 Raver1-Translokation zwischen Kern und Cytoplasma

Der genaue Translokationsmechanismus für Raver1 ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die C-terminale Kernlokalisationssequenz konnte experimentell bestätigt werden, und es gibt Hinweise auf weitere Transport-relevante Bereiche, darunter Kernexportsequenzen, die bisher jedoch nicht eindeutig identifiziert werden konnten (K. Falley, Diplomarbeit). Auch das exakte Zeitfenster der Translokation ist bisher nicht bekannt. Aus der Erstbeschreibung von Raver1 an differenzierenden C2C12-Zellen lässt sich ableiten, dass die Translokation an den Differenzierungsprozess gekoppelt ist. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass diese Translokation in allen drei Muskeltypen erfolgt. Die Frage, ob Raver1 direkt an der Ausbildung der Sarkomere beteiligt ist, oder erst zu einem späteren Zeitpunkt an diese Strukturen rekrutiert wird, konnte durch die vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden.

Erste Hinweise darauf, dass die Translokation von Raver1 nicht direkt in die Sarkomerbildung eingebunden ist, konnten aus Untersuchungen an primären Cardiomyocyten aus Mausembryonen gewonnen werden (unveröffentlichte Daten, E. Ehler). Während in den embryonalen Zellen bereits sarkomere Strukturen in der Immunfluoreszenz darstellbar sind, zeigt endogener Raver1, wie bereits erwähnt, eine vorwiegend nukleäre Lokalisation. Diese Raver1-Kernlokalisation in Cardiomyocyten zeigt, dass der Aufbau einer sarkomeren Struktur in den Zellen nicht abhängig von der Translokation von Raver1 ins Cytoplasma ist. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die spätere Rekrutierung von Raver1 einen zusätzlichen modulierenden Einfluss auf diese Struktur hat. Möglicherweise wird die Kernlokalisation von Raver1 in Cardiomyocyten durch den Entwicklungszustand der Zellen bedingt, die einerseits aus embryonalen Tieren gewonnen wurden und zudem durch den Isolationsprozess aus dem dreidimensionalen Gewebeverband gelöst wurden. Es wäre beispielsweise denkbar, dass die Raver1-Regulationsmechanismen vom Entwicklungszustand des Organismus abhängig sind, was mittels Analyse adulter Cardiomyocyten zu klären wäre. Zudem wäre denkbar, dass die cytoplasmatische Lokalisation von Raver1 möglicherweise durch mechanischen Stress oder/und durch die Adhäsion der Zellen im Gewebeverband ausgelöster Signale bedarf. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Lokalisationsanalyse von ankrd2/Arpp gemacht (Miller et al., 2003). Ankrd2/Arpp gehört zur Familie der "Muscle Ankyrin repeat"-Proteine (MARPs), deren Expression in Folge von Verletzungen, Hypertrophie oder Muskelstreckung induziert wird (Baumeister et al., 1997; Kuo et al., 1999; Aihara et al., 2000; Kemp et al., 2000). Wie Raver1 lokalisiert ankrd2/Arpp im Zellkern und in einem gestreiften Muster innerhalb der I-Bande adulter Herzen und Skelettmuskelfibrillen (Ishiguro et al., 2002; Tsukamoto et al., 2002); in embryonalen Ratten-Cardiomyocyten kann hingegen kein ankrd2/Arpp in den Myofibrillen nachgewiesen werden (Miller et al., 2003). Die I-Banden-Assoziation von ankrd2/Arpp könnte somit entwicklungsabhängig sein. Ein entsprechendes Modell könnte auch für Raver1 zutreffen.

4.4 Phosphorylierung von Raver1

Ein möglicher Regulationsmechanismus der Raver1-Translokation könnte die Phosphorylierung des Proteins darstellen, denn es ist bekannt, dass Proteinkinasen die Kern-Cytoplasma-Lokalisation einer großen Anzahl von Proteinen beeinflussen (Xiao et al., 1997; Komeili & O'Shea, 1999; Beals et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Raver1 *in vitro* durch die PKA und PKC α phosphoryliert wird. Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von Raver1 auch *in vivo* eine Rolle spielen könnte, lieferten erste MALDI-TOF Analysen, die eine Phosphorylierung an Serin 576 vermuten lassen. Dieser Serinrest liegt in einem RLLS-Motiv, das einem minimalen PKA-Konsensusmotiv (RXXS, Pearson & Kemp, 1991) entspricht. Interessanterweise wurde auch nur das C-terminale Raver1 Deletionsfragment (AS 442-748) das Serin 576 enthält, durch PKA deutlich phosphoryliert. Zudem ist die PKA bereits als Regulator des nucleocytoplasmatischen Transports beschrieben worden. Durch Phosphorylierung wird in der Regel die Interaktion zwischen einer Fracht

und einem Transportfaktor moduliert (Jans et al., 2000). So erhöht die Phosphorylierung des *Drosophila*-Transkriptionsfaktors Dorsal durch PKA die Bindungsaffinität des Proteins für Importin, wodurch ein verstärkter Kernimport von Dorsal bewirkt wird (Briggs et al., 1998). Im Gegensatz dazu führt ein PKA-"signaling" zur Lokalisation des Hefe-Transkriptionsfaktors Msn2 ins Cytoplasma (Gorner et al., 1998). Die Transportsignale vieler RNA-bindender Proteine beinhalten PKA-Konsensus-Motive, darunter die M9-Sequenz von hnRNP A1 (Michael et al., 1995). Auch die intrazelluläre Lokalisation des Raver1-verwandten hnRNP-Proteins PTB, welches als nukleärer Ligand von Raver1 beschrieben ist, wird durch PKA-Phosphorylierung eines Transportsignals modifiziert: PTB wird *in vitro* und *in vivo* von der PKA an einem im Kernexportsignal liegenden Serin phosphoryliert. Phosphoryliertes Protein lokalisiert im Cytoplasma, während unphosphoryliertes Protein ausschließlich im Zellkern vorliegt (Xie et al., 2003). Neben PKA-abhängigen Prozessen können jedoch auch weitere Signalwege die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen, darunter hnRNP K, beeinflussen. HnRNP K wird durch die MAPK/ERK-Kinase („mitogen-activated protein kinase/ extracellular-signal-regulated kinase“) direkt phosphoryliert, welches zu einer cytoplasmatischen Akkumulation des Proteins führt (Habelhah et al., 2001). Eine eventuelle Beeinflussung der Raver1-Lokalisation durch Phosphorylierung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Erste Beobachtungen zeigen, dass die nukleäre Lokalisation von Raver1 nach Stimulation von C2C12-Fibroblasten durch 10 μ M Forskolin, einem Aktivator der PKA, nicht modifiziert wird. Die erfolgreiche Aktivierung der PKA in den Zellen konnte anhand des „vasodilator-stimulated phosphoproteins“ (VASP), welches in phosphorylierter Form ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel zeigt (Butt et al., 1994; Harbeck et al., 2000), nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Allerdings ist bekannt, dass eine Forskolin-Behandlung von PC12-Zellen die intrazelluläre Lokalisation von PTB ebenfalls nicht beeinflusst, wohingegen eine Überexpression der PKA in denselben Zellen die cytoplasmatische Akkumulation durchaus induzieren kann (Xie et al., 2003). Somit ist auch für Raver1 ein PKA-abhängiges Pendeln weiterhin denkbar und muss durch weiterführende Versuche, die im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden konnten, geklärt werden.

Nicht nur die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins, sondern auch die Wechselwirkung mit Liganden innerhalb eines zellulären Kompartiments kann durch Phosphorylierung moduliert werden. So wird beispielsweise VASP in seiner Interaktion mit G- und F-Aktin durch Phosphorylierung reguliert (Harbeck et al., 2000; Walders-Harbeck et al., 2002). Sowohl die VASP-induzierte Aktin-Nukleation und- Polymerisation sowie die Bindung an Aktinfilamente und deren Organisation werden nach einer PKA-abhängigen Phosphorylierung des Proteins negativ beeinflusst.

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine weitere wichtige Kinase, welche u.a. die Organisation des Mikrofilamentsystems reguliert (Clark & Brugge, 1995; Keenan & Kelleher, 1998). Die Aktivierung von PKC führt in einer Vielzahl von Zelltypen zur Veränderungen des Cytoskeletts, und bis heute wurde eine Interaktion von PKC-Isoformen mit diversen Cytoskelett-assoziierten Proteinen

beschrieben. Die *in vitro* Phosphorylierung des Aktin-bindenden Proteins Calponin durch PKC führt zur einer Abnahme der Bindungsaffinität für Aktinfilamente (Winder & Walch 1990, Winder et al., 1993, Mino et al., 1995) und auch für den Raver1-Liganden Vinculin wurde eine Interaktion mit PKC beschrieben. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von Vinculin einen Einfluss auf die Bildung von Zell-Adhäsionskomplexen nimmt (Ziegler et al., 2002). Auch für Raver1 konnte nicht nur die *in vitro* Phosphorylierung, sondern auch eine Assoziation mit PKC α gezeigt werden.

Der Einfluss der Phosphorylierung auf Ligandenwechselwirkungen von Raver 1 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht umfassend geklärt werden. Erste Anzeichen aus *in vitro* Experimenten deuten allerdings darauf hin, dass die Interaktion von Raver1 mit VT und MVT sowie mit α -Actinin nicht durch PKA-Phosphorylierung modifiziert wird (nicht gezeigt). Die Raver1-Aktin-Interaktion scheint durch eine Raver1-Phosphorylierung ebenfalls nicht komplett inhibiert zu werden (nicht gezeigt). Genauere Analysen stehen jedoch noch aus.

Bisher kann nur spekuliert werden, welche Kinase Raver1 *in vivo* phosphoryliert. Ein weiterer möglicher Kandidat ist die in „Yeast Two-Hybrid“-Analysen als potentieller Raver1-Interaktionspartner identifizierte „mitogen-activated protein kinase 7“ (MAPK7), die auch „big MAP kinase 1“ (BMK1) oder „extracellular signal regulated kinase 5“ (ERK5) genannt wird. Die „mitogen-activated protein kinase“-Kaskaden spielen wichtige Rollen in der Transduktion extrazellulärer Signale zum Zellkern (Ahn et al., 1992) und nehmen so Einfluss auf Zellproliferation, Apoptose und Differenzierungsprozesse (Treisman 1996). BMK1 wird durch Wachstumsfaktoren oder Stress aktiviert und hat beispielsweise wichtige Funktionen in der Angiogenese und der Herzentwicklung (Hayashi et al., 2004a; Hayayhi et al., 2004b). Zudem bindet BMK1 direkt an den MEF2C- („myocyte enhancer factor 2C“) Transkriptionsfaktor, welcher auch die Muskel-spezifische Transkription aktiviert (Yang et al., 1998).

4.5 Neue Aspekte zur zellulären Funktion von Raver1

Die Identifizierung von Aktin als neuem Raver1-Liganden ist ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.2). Mit Aktin ist jetzt ein erster Ligand bekannt, mit dem eine Interaktion in Kern und Cytoplasma stattfinden kann und somit eine mögliche direkte Verbindung in der Raver1-vermittelten nucleo-cytoplasmatischen Kommunikation denkbar ist. Darüber hinaus zeigen aktuelle Untersuchungen, dass Aktin eine essenzielle Komponente in Transkriptions- und Transportprozessen darstellt. Auch in diesem Kontext ergeben sich neue Aspekte zur zellulären Bedeutung von Raver1.

Die bisher einzigen Daten zu einer möglichen Funktion von Raver1 deuten auf einen regulativen Einfluss bei PTB-vermittelten Spleißvorgängen hin. In einem *in vitro* System konnte gezeigt werden, dass es in Anwesenheit von Raver1 zu einer verstärkten Repression des Exons 3 des α -Tropomyosins kommt, die durch Inkorporation des alternativ gespleißten Exon 2 die Generierung einer Glattmuskelspezifischen Variante begünstigt (Gromak et al., 2003, Kapitel 1.2.3). Allerdings konnten diese Daten bisher nicht bei der Analyse von Raver1-„knock-out“-Mäusen bestätigt werden, die kein verändertes

Spleißmuster des α -Tropomyosins gegenüber Wildtyptieren aufweisen (M. Fabienke, persönliche Mitteilung). Eine direkte Interaktion von Raver1 mit RNA konnte bisher trotz vorhandener RRM's nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist eine generelle Beteiligung an RNA-abhängigen Prozessen wie auch dem Spleißen von mRNA (Abb. 48A) nicht prinzipiell auszuschließen, da sie auch, wie bereits in den *in vitro* Versuchen von Gromak et al. (2003) angedeutet, indirekt erfolgen könnte, indem durch die Wechselwirkung mit Raver1 die Aktivität von Proteinen moduliert wird, die an der mRNA Prozessierung beteiligt sind.

Alle bisher beschriebenen Vertreter der hnRNP-Familie übernehmen Aufgaben in der Transkriptionskontrolle oder beeinflussen nicht nur das Spleißen, sondern sind auch in weitere mRNA-Prozessierungsschritte wie beispielsweise die Polyadenylierung der Transkripte involviert (Kapitel 1.1.2.). Auch der mRNA-Transport, die Translationskontrolle im Cytoplasma und der mRNA-Turnover finden unter Beteiligung von hnRNP-Proteinen statt (Shuy & Wilkinson, 2000).

Auch für kernständiges Aktin wurde eine Beteiligung an der Transkription und am mRNA-Transport beschrieben, und es kann zudem direkt mit hnRNP-Proteinen interagieren (Percipalle et al., 2002). Beispielsweise wird Aktin während der Transkription in neu synthetisierte Balbianiring-prä-mRNP-Partikel von *Chironomus tentans* inkorporiert. In diesen Partikeln bindet Aktin an hnRNP-Proteine, darunter hrp36, ein hnRNP A1 ähnliches Protein und hrp65-2 (Percipalle et al., 2001; Percipalle 2003). Für die Aktin-hrp65-2-Interaktion wird eine Rolle bei der Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität von Zellen und in der Transkriptionselongation diskutiert. Erst kürzlich konnte für ein weiteres Mitglied der hnRNP-Familie, hnRNP U, eine funktionelle Assoziation mit Aktin im Zellkern gezeigt werden (Kukalev et al., 2005). Diese Interaktion scheint eine zentrale Rolle in der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkription zu spielen, denn die Zerstörung des hnRNP U-Aktin-Komplexes verhindert die RNA-Synthese *in vitro* und den Einbau von 5-Bromouridine 5'-triphosphat (BrUTP) in neu synthetisierte RNA *in vivo*. Auch für die RNA-Polymerase I und III- vermittelte Transkription konnte eine Beteiligung von Aktin gezeigt werden (Philimonenko et al., 2004; Hu et al., 2004; Visa, 2005).

Die direkte Bindung von Raver1 an verschiedene Aktinkonformationen konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden. Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass Raver1 sowohl im Kern als auch im Cytoplasma mit Aktin interagieren kann. In undifferenzierten C2C12-Zellen liegt das Protein in einem wahrscheinlich kernständigen Komplex mit Aktin und PTB vor (Kapitel 3.2.2, und Hüttelmaier et al., 2001). Neben den bisher favorisierten Spleißvorgängen (Jockusch et al., 2003) könnte Raver1 darüber hinaus über seine Aktinbindung an Transkriptionsprozessen beteiligt sein. (Abb. 43A).

Raver1 ist ein dynamisches Protein, das in der Lage ist, kontinuierlich zwischen Kern und Cytoplasma zu pendeln (Hüttelmaier et al., 2001). Daher könnte ihm auch eine Funktion bei Transportprozessen zukommen. Eine Beteiligung am viralen mRNA-Export wurde bereits für Aktin gezeigt (Hofmann et al., 2001).

Eine signifikante Translokation von Raver1 vom Kern ins Cytoplasma konnte bisher nur für differenziertes Muskelgewebe dargestellt werden. Es ist denkbar, dass Raver1 auch im Cytoplasma in mRNA-abhängige Prozesse involviert ist und dort an der Lokalisation und der lokalen Translation spezifischer mRNAs beteiligt ist (Jockusch et al., 2003). Sowohl für PTB (Tischendorf et al., 2004) als auch Aktin (Lu et al., 2004) wurde eine Beteiligung an der Translationskontrolle viraler Proteine des Hepatitis C Virus beschrieben. Die Translation wird dabei im Wesentlichen über eine Cis-aktive RNA-Sequenz ("internal ribosomal entry site", IRES) reguliert, für die eine spezifische Bindung durch Aktin nachgewiesen werden konnte (Lu et al., 2004). In Assoziation mit Aktin und PTB könnte auch Raver1 in Translationsprozesse eingebunden sein.

Darüber hinaus könnte Raver1, wie bereits früher postuliert, gerade in Muskelzellen an der spezifischen Verankerung verschiedener mRNAs beteiligt sein. Die bisherigen Beobachtungen legen nahe, dass dies insbesondere an Aktin- assoziierten Strukturen erfolgt (siehe auch Kapitel 1.2.3 und Abb. 43B). Die Verankerung an Fokalkontakten (Hüttelmaier et al., 2001 und Abb. 43B), der I-Z-I-Region oder muskulären Adhärenzverbindungen (Abb. 43C) könnte hierbei sowohl über Vinculin, α -Actinin, aber auch direkt über Aktin erfolgen.

Es hat sich gezeigt, dass das Sarkomer keine statische Struktur ist, sondern sich die Komponenten in einem konstanten Gleichgewicht zwischen koordinierter Proteinsynthese, Degradation, Zusammensetzung und Erhaltung befinden (Clark et al., 2002). Diese Prozesse sind streng reguliert, wozu auch die spezifische Lokalisation von mRNA beiträgt. Darüber hinaus könnte Raver1 im Bereich der I-Bande als Adapterprotein für die Lokalisation weiterer Proteine dienen. Ein als solch ein Adapterprotein fungierendes Protein der I-Bande ist DRAL/FHL2. Es verankert metabolische Enzyme (Phosphofructokinase, Adenylatcyclase, Kreatinkinase) im Sarkomer und somit in Bereichen starken Energieverbrauchs (Lange et al., 2002). Mitglieder der MARP („Muscle Ankyrin-Repeat Protein“) - Proteinfamilie wie CARP („Cardiac Ankyrin-Repeat Protein“) und DARP („Diabetes Related Ankyrin-Repeat Protein“) zeigen eine Raver1-ähnliche Lokalisation im Nukleus und in der I-Banden-Region von Myofibrillen. Zusammen mit Myopalladin, einem ebenso in den I-Banden und im Zellkern beschriebenen Protein (Bang et al., 2001), wird für diese Proteine eine potentielle Rolle bei der Regulation der Genexpression in Muskelzellen diskutiert (Miller et al., 2003, Bang et al., 2001, Clark et al., 2002), eine Rolle, die auch Raver1 übernehmen könnte.

Eine primär strukturelle Funktion kann aufgrund bisheriger Daten für Raver1 nicht angenommen werden. Zum einen weisen Raver1 „knock-out“-Mäuse keine Auffälligkeiten in ihrer Muskulatur auf (M. Fabienke, persönliche Kommunikation), zum anderen zeigen die Lokalisationsstudien an embryonalen Cardiomyocyten, dass der Aufbau der Sarkomere unabhängig von Raver1 erfolgt, der in diesen Zellen noch überwiegend nukleär lokalisiert ist (E. Ehler, unveröffentlicht).

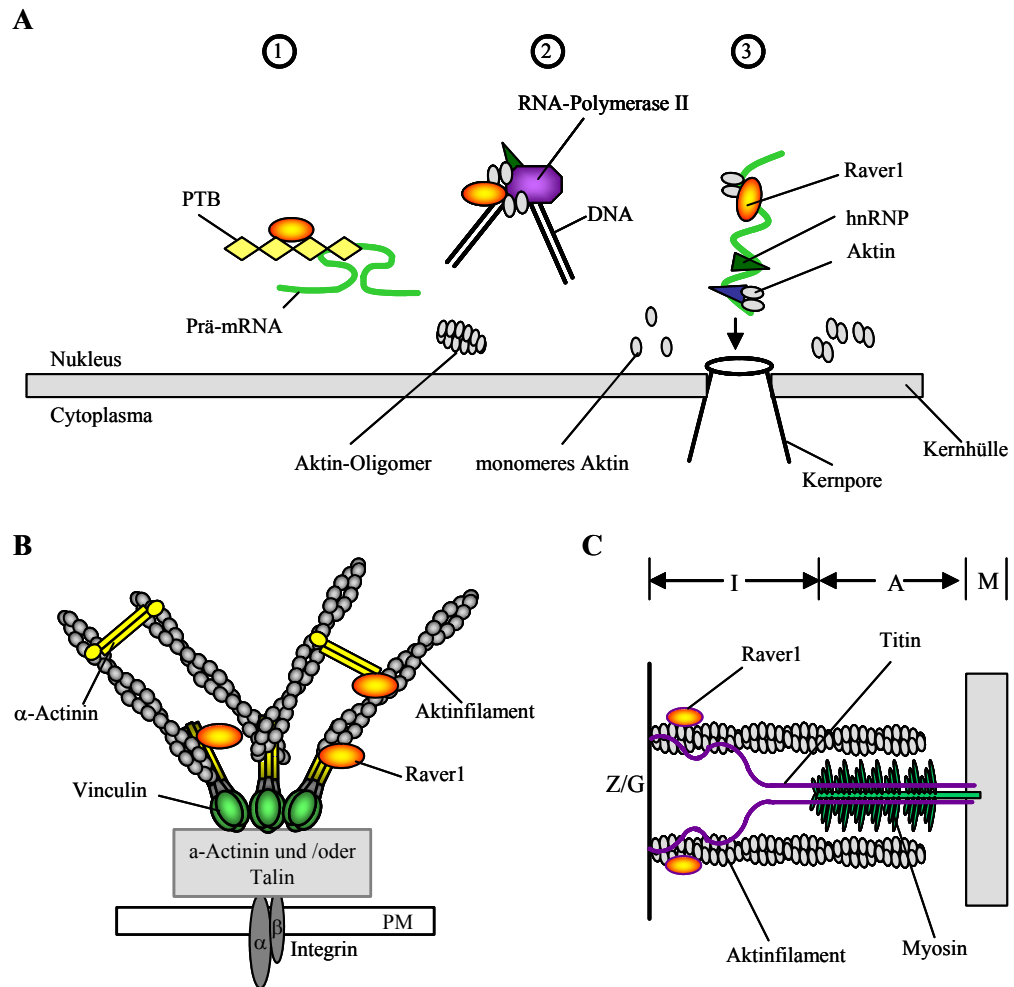


Abbildung 43: Schematische Darstellung hypothetischer Raver1-Funktionen und möglicher Raver1-Aktin-Komplexe

A: Schematische Darstellung möglicher Raver1-Funktionen im Zellkern. (1) Raver1 kolokalisiert mit PTB im Zellkern und beeinflusst PTB-abhängige Spleiß-Prozesse. Eine Beteiligung an weiteren Spleiß-Prozessen ist denkbar. In einem Komplex mit Aktin könnte Raver1 an Transkriptionsprozessen (2), beispielsweise der RNA-Polymerase II-vermittelten Transkription oder dem mRNA-Transport (3) beteiligt sein. In beiden Prozessen sind ebenfalls hnRNP-Proteine beteiligt (durch Dreiecke symbolisiert), die dabei direkt mit Aktin interagieren können. Die genaue Konformation von Kern-Aktin konnte bisher nicht geklärt werden, was hier durch unterschiedliche Darstellungen von Aktin (kurze Oligomere, Dimere, Monomere) herausgestellt wird. **B:** Schematische Darstellung der Raver1-Lokalisation in Adhäsionskomplexen. Aktinfilamente werden über Vinculin an einen Adhäsionskomplex bestehend aus z.B. α-Actinin und/oder Talin gebunden. α-Actinin kann zudem die Aktinfilamente untereinander verknüpfen. Raver1 könnte in diesem Komplex mit Vinculin und/oder α-Actinin interagieren, jedoch auch direkt an Aktinfilamente binden und so eventuell die Bindung der Filamente an den Adhäsionskomplex verstärken. PM: Plasmamembran, α,β: Integrin α/β. Das graue Rechteck symbolisiert den Adhäsionskomplex, der die Vinculin-Kopf- bindenden Proteine α-Actinin und/oder Talin enthält. **C:** Schematische Darstellung der Raver1-Lokalisation im Bereich eines Sarkomers. Aktinfilamente sind in der Z-Linie (Z) verankert, durchspannen die I-Bande und überlappen im Bereich der A-Bande mit Myosin-dicken-Filamenten, welche in der M-Bande verankert sind. Einzelne Titin-Moleküle durchspannen ein Halbsarkomer. Raver1 lokalisiert in der I-Z-I-Region und könnte hier direkt an Aktinfilamente binden. Im Herzmuskel lokalisiert Raver1 zudem in Glanzsteifen (G), die die einzelnen Cardiocyten miteinander verknüpfen.

4.6 Ausblick

Die Identifizierung von Aktin als neuem Liganden sowie die in dieser Arbeit erhaltenen Hinweise auf eine mögliche Regulation von Raver1 durch Phosphorylierung oder saure Phospholipide eröffnen eine Vielzahl neuer Ansatzpunkte für weitere Analysen.

Ein zentraler Punkt weiterer Arbeiten sollte sicherlich die Aufklärung der nukleären Funktion von Raver1 sein, da das Protein ubiquitär exprimiert wird und in den meisten bisher untersuchten Zelltypen überwiegend im Kern lokalisiert. Zunächst einmal wäre zu klären, ob Raver1 über seine RRM's direkt mit RNA interagieren kann. Für *in vitro* Studien stünde nun das rekombinante Protein zur Verfügung, *in vivo* Analysen könnten durch das breite Spektrum an verfügbaren Raver1-Antikörpern erleichtert werden. Auch in seinem Einfluss auf PTB-vermittelte RNA-Bindung und –Prozessierung könnte das Raver1-Protein nun biochemisch analysiert werden. In diesem Zusammenhang wäre auch eine weitere Eingrenzung des Interaktionsbereichs von Raver1 und PTB wünschenswert. Da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, dass Overlay-Experimente mit *in vitro* translatierten Deletionskonstrukten keine eindeutigen Daten liefern (eigene Beobachtungen und Diplomarbeit M. Rohde) sollten diese Interaktionsstudien eher in Lösung mit anschließender Immunpräzipitation oder „pulldown“ eines rekombinanten PTB-GST-Konstrukts durchgeführt werden.

Darüber hinaus sollte die Bedeutung der Raver1-Aktin-Interaktion für Aktin-vermittelte Kernprozesse näher charakterisiert werden. Da für Aktin bereits eine Beteiligung am Export viraler RNAs (Hofmann et al., 2001) und möglicherweise auch deren Translation gezeigt werden konnte (Lu et al., 2004) wären virale RNAs ein geeignetes Testsystem, um eine mögliche Beteiligung von Raver1 zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt, der in vorherigen Analysen wenig Beachtung fand, ist die Einbindung von Raver1 über die Aktinwechselwirkung in die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression, wie sie erst kürzlich für ein verwandtes Protein, hnRNP U, gezeigt wurde (Kuklav et al., 2005). In diesem Zusammenhang wäre ebenfalls eine genauere Eingrenzung der Bindungsbereiche sinnvoll.

Ein zweiter Schwerpunkt müsste die nähere Untersuchung von Raver1 in Muskelgewebe sein. Hierbei sollten zum einen die begonnen Gelfiltrationsanalysen auf verschiedene Muskelgewebe ausgeweitet werden, um cytoplasmatische Raver1-haltige Komplexe zu isolieren und analysieren. Diese könnten Aufschluss über die molekulare Integration von Raver1 in der I-Z-I-Region gestreifter Muskulatur geben. Eine sinnvolle Ergänzung wären hierbei weitere elektronenmikroskopische Analysen, unter anderem im Zusammenhang mit *in vitro* Dekorationsexperimenten von Aktinfilamenten mit rekombinantem Raver1.

Das genaue Zeitfenster der Translokation von Raver1 während der Muskeldifferenzierung sollte mittels weiterer Analysen an Cardiomyocyten analysiert werden. Zum einen könnten vergleichende Studien zwischen embryonalen und adulten Herzmuskelzellen zeigen, ob der gezielte Kernexport von Raver1 Entwicklungs-abhängig ist. Zum anderen könnten Transfektionsexperimente zeigen, ob in

embryonalen und adulten Herzmuskelzellen unterschiedliche Signalwege angeschaltet sind, die auch die Lokalisation von Raver1 beeinflussen. Erste Hinweise darauf, dass sich bereits die embryonalen Cardiomyocyten von undifferenzierten C2C12-Zellen unterscheiden, ergaben Untersuchungen, in denen die beiden komplementären Deletionsfragmente Raver1 Δ C (AS 1-441) und Raver1 Δ N (AS 442-148) exprimiert wurden. Im Gegensatz zu einer nukleären Lokalisation von Raver1 Δ N und einer homogenen Kern-Cytoplasma-Verteilung von Raver1 Δ C zeigen beide Fragmente in embryonalen Cardiomyocyten eine Assoziation mit sogenannten „stress-fibre-like-structures“ und sind auch in einer sarkomeren Streifung zu finden (E. Ehler, unveröffentlicht).

Schließlich sollten die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten möglichen Regulationsmechanismen detailliert analysiert werden. Die zuvor erwähnten Transfektionsexperimente in C2C12-Zellen und embryonalen Cardiomyocyten deuten bereits auf eine differenzielle Regulation des Raver1-Proteins in Abhängigkeit des zellulären Differenzierungszustands hin. Durch Ausweitung der MALDI-TOF-Analysen, die Koexpression von Kinasen oder deren Stimulation in Zellkulturen oder die Analyse von Phosphomutanten, in denen potentielle Phosphorylierungsstellen mutiert sind, könnten die Phosphorylierungsstellen bestimmt und ihr Einfluss auf das Bindungsverhalten von Raver1 und die subzelluläre Lokalisation des Proteins untersucht werden. Darüber hinaus müsste die Bindung von Raver1 an saure Phospholipide und deren Einfluss auf das Raver1-Protein weitergehend untersucht werden.

5 Literatur

Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J.* 16:3797-804.

Ahn, N.G., R. Seger and E.G. Krebs. 1992. The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 992-9.

Ahuja, P., E. Perriard, J.C. Perriard, and E. Ehler. 2004. Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *J Cell Sci.* 117:3295-306.

Aihara, Y., M. Kurabayashi, Y. Saito, Y. Ohyama, T. Tanaka, S. Takeda, K. Tomaru, K. Sekiguchi, M. Arai, T. Nakamura, and R. Nagai. 2000. Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension.* 36:48-53.

Bakolitsa, C., J.M. de Pereda, C.R. Bagshaw, D.R. Critchley, and R.C. Liddington. 1999. Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell.* 99:603-13.

Bakolitsa, C., D.M. Cohen, L.A. Bankston, A.A. Bobkov, G.W. Cadwell, L. Jennings, D.R. Critchley and R.C. Liddington. 2004. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature.* 430:583-6.

Balda, M.S., and K. Matter. 2003. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 13:310-8.

Bang, M.L., R.E. Mudry, A.S. McElhinny, K. Trombitas, A.J. Geach, R. Yamasaki, H. Sorimachi, H. Granzier, C.C. Gregorio, and S. Labeit. 2001. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol.* 153:413-27.

Barkalow, K., and J.H. Hartwig. 1995. Actin cytoskeleton. Setting the pace of cell movement. *Curr Biol.* 5:1000-2.

Barstead, R.J., and R.H. Waterston. 1991. Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol.* 114:715-24.

Bass, M.D., B. Patel, I.G. Barsukov, I.J. Fillingham, R. Mason, B.J. Smith, C.R. Bagshaw, and D.R. Critchley. 2002. Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem J.* 362:761-8.

Bassell, G.J., Y. Oleynikov, and R.H. Singer. 1999. The travels of mRNAs through all cells large and small. *Faseb J.* 13:447-54.

Baumeister, A., S. Arber, and P. Caroni. 1997. Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J Cell Biol.* 139:1231-42.

Beals, C.R., C.M. Sheridan, C.W. Turck, P. Gardner, and G.R. Crabtree. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science.* 275:1930-4.

Beggs, A.H., T.J. Byers, J.H. Knoll, F.M. Boyce, G.A. Bruns, and L.M. Kunkel. 1992. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem.* 267:9281-8.

- Belkin, A.M., O.I. Ornatsky, M.A. Glukhova, and V.E. Koteliansky. 1988. Immunolocalization of meta-vinculin in human smooth and cardiac muscles. *J Cell Biol.* 107:545-53.
- Bendori, R., D. Salomon, and B. Geiger. 1989. Identification of two distinct functional domains on vinculin involved in its association with focal contacts. *J Cell Biol.* 108:2383-93.
- Bettinger, B.T., D.M. Gilbert and D.C. Amberg. 2004. Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5: 410-15.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Black, B.E., J.M. Holaska, F. Rastinejad, and B.M. Paschal. 2001. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol.* 11:1749-58.
- Blanchard, A., V. Ohanian, and D. Critchley. 1989. The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil.* 10:280-9.
- Borgon, R.A., C. Vonnrhein, G. Bricogne, P.R. Bois, and T. Izard. 2004. Crystal structure of human vinculin. *Structure (Camb).* 12:1189-97.
- Borman, A., M.T. Howell, J.G. Patton, and R.J. Jackson. 1993. The involvement of a spliceosome component in internal initiation of human rhinovirus RNA translation. *J Gen Virol.* 74 (Pt 9):1775-88.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Briggs, L.J., D. Stein, J. Goltz, V.C. Corrigan, A. Efthymiadis, S. Hubner, and D.A. Jans. 1998. The cAMP-dependent protein kinase site (Ser312) enhances dorsal nuclear import through facilitating nuclear localization sequence/importin interaction. *J Biol Chem.* 273:22745-52.
- Brindle, N.P., M.R. Holt, J.E. Davies, C.J. Price, and D.R. Critchley. 1996. The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J.* 318 (Pt 3):753-7.
- Burn, P., and M.M. Burger. 1987. The cytoskeletal protein vinculin contains transformation-sensitive, covalently bound lipid. *Science.* 235:476-9.
- Burridge, K., and P. Mangeat. 1984. An interaction between vinculin and talin. *Nature.* 308:744-6.
- Carlier, M.F. 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem.* 266:1-4.
- Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V Hoppe, J. Hoppe and U. Walter. 1994. cAMP- and CGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem.* 269: 14509-17.
- Carpen, O., P. Pallai, D.E. Staunton, and T.A. Springer. 1992. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J Cell Biol.* 118:1223-34.
- Cartwright, P., and K. Helin. 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 57:1193-206.
- Chandrasekar I., T.E. Stradal, M.R. Holt, F. Entschladen, B. M. Jockusch and W. H. Ziegler. 2005. Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *J Cell Sci.* In press.
- Clark, E.A., and J.S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268:233-9.

- Clark, K.A., A.S. McElhinny, M.C. Beckerle, and C.C. Gregorio. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:637-706.
- Clark, T.G., and R.W. Merriam. 1977. Diffusible and bound actin nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell.* 12:883-91.
- Clark, T.G., and J.L. Rosenbaum. 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell.* 18:1101-8.
- Cocco, L., A.M. Martelli, S. Capitani, N.M. Maraldi, G. Mazzotti, O. Barnabei, R.S. Gilmour, and F.A. Manzoli. 1995. Nuclear inositol lipid cycle and differentiation. *Adv Enzyme Regul.* 35:23-33.
- Cote, J., S. Dupuis, and J.Y. Wu. 2001. Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *J Biol Chem.* 276:8535-43.
- de Hoog, C.L., L.J. Foster, and M. Mann. 2004. RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell.* 117:649-62.
- Dedhar, S. 1994. Novel functions for calreticulin: interaction with integrins and modulation of gene expression? *Trends Biochem Sci.* 19:269-71.
- DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burridge. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* 159:881-91.
- Divecha, N., A.J. Letcher, H.H. Banfic, S.G. Rhee, and R.F. Irvine. 1995. Changes in the components of a nuclear inositide cycle during differentiation in murine erythroleukaemia cells. *Biochem J.* 312 (Pt 1):63-7.
- Dlugosz, A.A., P.B. Antin, V.T. Nachmias, and H. Holtzer. 1984. The relationship between stress fiber-like structures and nascent myofibrils in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol.* 99:2268-78.
- dos Remedios, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, and N.J. Nosworthy. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83:433-73.
- Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:195-205.
- Egly, J.M., N.G. Miyamoto, V. Moncollin, and P. Chambon. 1984. Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? *Embo J.* 3:2363-71.
- Ehler, E., R. Horowitz, C. Zuppinger, R.L. Price, E. Perriard, M. Leu, P. Caroni, M. Sussman, H.M. Eppenberger, and J.C. Perriard. 2001. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Biol.* 153:763-72.
- Ehler, E., B.M. Rothen, S.P. Hammerle, M. Komiyama, and J.C. Perriard. 1999. Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci.* 112 (Pt 10):1529-39.
- Fukami K., Endo, T., Imamura, M., and T. Takenawa. 1994. alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosin kinase. *J Biol Chem.* 269:1518-22.
- Fraley, T.S., T.C. Tran, A.M. Corgan, C.A. Nash, J. Hao, D.R. Critchley, and J.A. Greenwood. 2003. Phosphoinositide binding inhibits alpha-actinin bundling activity. *J Biol Chem.* 278:24039-45.

- Geiger, B. 1979. A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*. 18:193-205.
- Geiger, B., T. Volk, T. Volberg, and R. Bendori. 1987. Molecular interactions in adherens-type contacts. *J Cell Sci Suppl*. 8:251-72.
- Ghetti, A., S. Pinol-Roma, W.M. Michael, C. Morandi, and G. Dreyfuss. 1992. hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res*. 20:3671-8.
- Giehl, K., R. Valenta, M. Rothkegel, M. Ronsiek, H.G. Mannherz, and B.M. Jockusch. 1994. Interaction of plant profilin with mammalian actin. *Eur J Biochem*. 226:681-9.
- Gilmore, A.P., and K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*. 381:531-5.
- Gilmore, A.P., P. Jackson, G.T. Waites, and D.R. Critchley. 1992. Further characterisation of the talin-binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Sci*. 103 (Pt 3):719-31.
- Gilmore, A.P., C. Wood, V. Ohanian, P. Jackson, B. Patel, D.J. Rees, R.O. Hynes, and D.R. Critchley. 1993. The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains. *J Cell Biol*. 122:337-47.
- Gonsior, S.M., S. Platz, S. Buchmeier, U. Scheer, B.M. Jockusch, and H. Hinssen. 1999. Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci*. 112 (Pt 6):797-809.
- Gorlich, D., and U. Kutay. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:607-60.
- Gorner, W., E. Durchschlag, M.T. Martinez-Pastor, F. Estruch, G. Ammerer, B. Hamilton, H. Ruis, and C. Schuller. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev*. 12:586-97.
- Gossen M. and Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mamalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S*. 89:5547-51.
- Gottardi, C.J., and B.M. Gumbiner. 2001. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol*. 11:R792-4.
- Gromak, N., A. Rideau, J. Southby, A.D. Scadden, C. Gooding, S. Huttelmaier, R.H. Singer, and C.W. Smith. 2003. The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing. *Embo J*. 22:6356-64.
- Gumbiner, B.M., and P.D. McCrea. 1993. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl*. 17:155-8.
- Habelhah, H., K. Shah, L. Huang, A. Ostareck-Lederer, A.L. Burlingame, K.M. Shokat, M.W. Hentze, and Z. Ronai. 2001. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol*. 3:325-30.
- Hache, R.J., R. Tse, T. Reich, J.G. Savory, and Y.A. Lefebvre. 1999. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 274:1432-9.

- Harbeck, B., S. Huttelmaier, K. Schluter, B.M. Jockusch, and S. Illenberger. 2000. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem.* 275:30817-25.
- Harper, J.W., Adami, G.R. Wei, N., Keyomarsi, K. and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interaction protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 79:303-314.
- Hayashi, M., S.W. Kim, K. Imanaka-Yoshida, T. Yoshida, E.D. Abel, B. Eliceiri, Y. Yang R.J. Ulevitch and J.D. Lee. 2004a. Targeted deletion of BMK1/ERK5 in adult mice perturbs vascular integrity and leads to endothelial failure. *J Clin Invest.* 113:1138-48.
- Hayashi, M. and J.D. Lee. 2004b. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout-mice. *J.Mol Med.* 82: 800-8.
- Hoffmann, F., and Rinas, U. 2004. Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 89:143-61.
- Hofmann, W., B. Reichart, A. Ewald, E. Muller, I. Schmitt, R.H. Stauber, F. Lottspeich, B.M. Jockusch, U. Scheer, J. Hauber, and M.C. Dabauvalle. 2001. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol.* 152:895-910.
- Hofmann, W.A., L. Stojiljkovic, B. Fuchsova, G.M. Vargas, E. Mavrommatis, V. Philimonenko, K. Kysela, J.A. Goodrich, J.L. Lessard, T.J. Hope, P. Hozak, and P. de Lanerolle. 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol.* 6:1094-101.
- Holaska, J.M., B.E. Black, D.C. Love, J.A. Hanover, J. Leszyk, and B.M. Paschal. 2001. Calreticulin Is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol.* 152:127-40.
- Honda, K., T. Yamada, R. Endo, Y. Ino, M. Gotoh, H. Tsuda, Y. Yamada, H. Chiba, and S. Hirohashi. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 140:1383-93.
- Horvath, A.R., G.M. Asijee, and L. Muszbek. 1992. Cytoskeletal assembly and vinculin-cytoskeleton interaction in different phases of the activation of bovine platelets. *Cell Motil Cytoskeleton.* 21:123-31.
- Horvath, A.R., and S. Kellie. 1990. Regulation of integrin mobility and cytoskeletal association in normal and RSV-transformed chick embryo fibroblasts. *J Cell Sci.* 97 (Pt 2):307-15.
- Hu, P., S. Wu, and N. Hernandez. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 18:3010-5.
- Huang, S., T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, and D.L. Spector. 1997. The dynamic organization of the perinucleolar compartment in the cell nucleus. *J Cell Biol.* 137:965-74.
- Hubner, S., D.A. Jans, and D. Drenckhahn. 2001. Roles of cytoskeletal and junctional plaque proteins in nuclear signaling. *Int Rev Cytol.* 208:207-65.
- Huttelmaier, S., P. Bubeck, M. Rudiger, and B.M. Jockusch. 1997. Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem.* 247:1136-42.
- Huttelmaier, S., B. Harbeck, O. Steffens, T. Messerschmidt, S. Illenberger, and B.M. Jockusch. 1999. Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* 451:68-74.

- Huttelmaier, S., S. Illenberger, I. Grosheva, M. Rudiger, R.H. Singer, and B.M. Jockusch. 2001. Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol.* 155:775-86.
- Huttelmaier, S., O. Mayboroda, B. Harbeck, T. Jarchau, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1998. The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol.* 8:479-88.
- Ishiguro, N., T. Baba, T. Ishida, K. Takeuchi, M. Osaki, N. Araki, E. Okada, S. Takahashi, M. Saito, M. Watanabe, C. Nakada, Y. Tsukamoto, K. Sato, K. Ito, M. Fukayama, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2002. Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol.* 160:1767-78.
- Ito, S., D.K. Werth, N.D. Richert, and I. Pastan. 1983. Vinculin phosphorylation by the src kinase. Interaction of vinculin with phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* 258:14626-31.
- Izard, T., G. Evans, R.A. Borgon, C.L. Rush, G. Bricogne, and P.R. Bois. 2004. Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature.* 427:171-5.
- Izard, T., and C. Vornrhein. 2004. Structural basis for amplifying vinculin activation by talin. *J Biol Chem.* 279:27667-78.
- Jans, D.A., C.Y. Xiao, and M.H. Lam. 2000. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays.* 22:532-44.
- Jockusch, B.M., M. Becker, I. Hindennach, and E. Jockusch. 1974. Slime mould actin: homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. *Exp Cell Res.* 89:241-6.
- Jockusch, B.M., D.F. Brown, and H.P. Rusch. 1971. Synthesis and some properties of an actin-like nuclear protein in the slime mold *Physarum polycephalum*. *J Bacteriol.* 108:705-14.
- Jockusch, B.M., S. Huttelmaier, and S. Illenberger. 2003. From the nucleus toward the cell periphery: a guided tour for mRNAs. *News Physiol Sci.* 18:7-11.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995. The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun.* 210:159-64.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 2000. Actin activates a cryptic dimerization potential of the vinculin tail domain. *J Biol Chem.* 275:95-105.
- Jones, P., P. Jackson, G.J. Price, B. Patel, V. Ohanion, A.L. Lear, and D.R. Critchley. 1989. Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol.* 109:2917-27.
- Kamath, R.V., D.J. Leary, and S. Huang. 2001. Nucleocytoplasmic shuttling of polypyrimidine tract-binding protein is uncoupled from RNA export. *Mol Biol Cell.* 12:3808-20.
- Kawamoto, S., and H. Hidaka. 1984. Ca²⁺-activated, phospholipid-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of actin-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 118:736-42.
- Keenan, C., and D. Kelleher. 1998. Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal.* 10:225-32.
- Kemp, T.J., T.J. Sadusky, F. Saltisi, N. Carey, J. Moss, S.Y. Yang, D.A. Sassoon, G. Goldspink, and G.R. Coulton. 2000. Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics.* 66:229-41.

- Keon, B.H., S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund, and W.W. Franke. 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol.* 134:1003-18.
- Khaitlina, S., J.H. Collins, I.M. Kuznetsova, V.P. Pershina, I.G. Synakevich, K.K. Turoverov, and A.M. Usmanova. 1991. Physico-chemical properties of actin cleaved with bacterial protease from E. coli A2 strain. *FEBS Lett.* 279:49-51.
- Khaitlina, S.Y., J. Moraczewska, and H. Strzelecka-Golaszewska. 1993. The actin/actin interactions involving the N-terminus of the DNase-I-binding loop are crucial for stabilization of the actin filament. *Eur J Biochem.* 218:911-20.
- Komeili, A., and E.K. O'Shea. 1999. Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science.* 284:977-80.
- Koteliansky, V.E., and G.N. Gneushev. 1983. Vinculin localization in cardiac muscle. *FEBS Lett.* 159:158-60.
- Krecic, A.M., and M.S. Swanson. 1999. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 11:363-71.
- Kroemker, M., A.H. Rudiger, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1994. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett.* 355:259-62.
- Kukalev, A., Nord, Y., Palmberg, C. Bergmann, T. and P. Percipalle. 2005. Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nature Structural & Molecular Biology.* 12: 238-244.
- Kuo, H., J. Chen, P. Ruiz-Lozano, Y. Zou, M. Nemer, and K.R. Chien. 1999. Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development.* 126:4223-34.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lange, S., D. Auerbach, P. McLoughlin, E. Perriard, B.W. Schafer, J.C. Perriard, and E. Ehler. 2002. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci.* 115:4925-36.
- Lappalainen, P., M.M. Kessels, M.J. Cope, and D.G. Drubin. 1998. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell.* 9:1951-9.
- Lassing, I., and U. Lindberg. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature.* 314:472-4.
- Li, B., and T.S. Yen. 2002. Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein. *J Biol Chem.* 277:10306-14.
- Liu, Q., and G. Dreyfuss. 1995. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 15:2800-8.
- Lou, H., R.F. Gagel, and S.M. Berget. 1996. An intron enhancer recognized by splicing factors activates polyadenylation. *Genes Dev.* 10:208-19.
- Lu, H., W. Li, W.S. Noble, D. Payan, and D.C. Anderson. 2004. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res.* 3:949-57.

- Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P.M. Schlag, W. Birchmeier, and J. Behrens. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol.* 22:1184-93.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1999. Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol.* 146:267-72.
- Maraldi, N.M., L. Cocco, S. Capitani, G. Mazzotti, O. Barnabei, and F.A. Manzoli. 1994. Lipid-dependent nuclear signalling: morphological and functional features. *Adv Enzyme Regul.* 34:129-43.
- Matera, A.G., M.R. Frey, K. Margelot, and S.L. Wolin. 1995. A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol.* 129:1181-93.
- Menkel, A.R., M. Kroemker, P. Bubeck, M. Ronsiek, G. Nikolai, and B.M. Jockusch. 1994. Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol.* 126:1231-40.
- Michael, W.M., M. Choi, and G. Dreyfuss. 1995. A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell.* 83:415-22.
- Miller, M.K., M.L. Bang, C.C. Witt, D. Labeit, C. Trombitas, K. Watanabe, H. Granzier, A.S. McElhinny, C.C. Gregorio, and S. Labeit. 2003. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol.* 333:951-64.
- Millonig, R., H. Salvo, and U. Aebi. 1988. Probing actin polymerization by intermolecular cross-linking. *J Cell Biol.* 106:785-96.
- Mills, M., N. Yang, R. Weinberger, D.L. Vander Woude, A.H. Beggs, S. Easteal, and K. North. 2001. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Hum Mol Genet.* 10:1335-46.
- Mino, T., U. Yuasa, M. Naka, and T. Tanaka. 1995. Phosphorylation of calponin mediated by protein kinase C in association with contraction in porcine coronary artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 208:397-404.
- Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, and R.Y. Tsien. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 388:882-7.
- Morris, E.J., and A.B. Fulton. 1994. Rearrangement of mRNAs for costamere proteins during costamere development in cultured skeletal muscle from chicken. *J Cell Sci.* 107 (Pt 3):377-86.
- Mulder, J., M. Poland, M.F. Gebbink, J. Calafat, W.H. Moolenaar, and O. Kranenburg. 2003. p116Rip is a novel filamentous actin-binding protein. *J Biol Chem.* 278:27216-23.
- Nakielnny, S., and G. Dreyfuss. 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell.* 99:677-90.
- Niggli, V., D.P. Dimitrov, J. Brunner, and M.M. Burger. 1986. Interaction of the cytoskeletal component vinculin with bilayer structures analyzed with a photoactivatable phospholipid. *J Biol Chem.* 261:6912-8.
- Nishizuka, Y. 1984. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* 225:1365-70.

- Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J.* 9:484-96.
- Olson, T.M., S. Illenberger, N.Y. Kishimoto, S. Huttelmaier, M.T. Keating, and B.M. Jockusch. 2002. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 105:431-7.
- Otey, C.A., F.M. Pavalko, and K. Burridge. 1990. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol.* 111:721-9.
- Otto, J.J. 1983. Detection of vinculin-binding proteins with an ¹²⁵I-vinculin gel overlay technique. *J Cell Biol.* 97:1283-7.
- Otto, J.J. 1990. Vinculin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 16:1-6.
- Palacios, I.M., and D. St Johnston. 2001. Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:569-614.
- Pardo, J.V., J.D. Siliciano, and S.W. Craig. 1983. Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J Cell Biol.* 97:1081-8.
- Pardo, J.V., J.D. Siliciano, and S.W. Craig. 1983. A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1008-12.
- Pearson, R.B. and B.E.Kemp.1991. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specific motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 200:62-81.
- Pederson, T., and U. Aebi. 2002. Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol.* 140:3-9.
- Percipalle, P., N. Fomproix, K. Kylberg, F. Miralles, B. Bjorkroth, B. Daneholt, and N. Visa. 2003. An actin-ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6475-80.
- Percipalle, P., A. Jonsson, D. Nashchekin, C. Karlsson, T. Bergman, A. Guialis, and B. Daneholt. 2002. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res.* 30:1725-34.
- Percipalle, P., J. Zhao, B. Pope, A. Weeds, U. Lindberg, and B. Daneholt. 2001. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol.* 153:229-36.
- Perez, I., J.G. McAfee, and J.G. Patton. 1997. Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry.* 36:11881-90.
- Perriard, J.C., A. Hirschy, and E. Ehler. 2003. Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med.* 13:30-8.
- Philimonenko, V.V., J. Zhao, S. Iben, H. Dingova, K. Kysela, M. Kahle, H. Zentgraf, W.A. Hofmann, P. de Lanerolle, P. Hozak, and I. Grummt. 2004. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol.* 6:1165-72.
- Pilipenko, E.V., E.G. Viktorova, S.T. Guest, V.I. Agol, and R.P. Roos. 2001. Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *Embo J.* 20:6899-908.
- Pines, J. 1999. Cell cycle. Checkpoint on the nuclear frontier. *Nature.* 397:104-5.

- Price, G.J., P. Jones, M.D. Davison, B. Patel, R. Bendori, B. Geiger, and D.R. Critchley. 1989. Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem J.* 259:453-61.
- Rando, O.J., K. Zhao, and G.R. Crabtree. 2000. Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 10:92-7.
- Reinhard, M., M. Rudiger, B.M. Jockusch, and U. Walter. 1996. VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett.* 399:103-7.
- Romanelli, M.G., P. Lorenzi, and C. Morandi. 2000. Organization of the human gene encoding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein type I (hnRNP I) and characterization of hnRNP I related pseudogene. *Gene.* 255:267-72.
- Rudiger, M., N. Korneeva, C. Schwienbacher, E.E. Weiss, and B.M. Jockusch. 1998. Differential actin organization by vinculin isoforms: implications for cell type-specific microfilament anchorage. *FEBS Lett.* 431:49-54.
- Ruzanov, P.V., V.M. Evdokimova, N.L. Korneeva, J.W. Hershey, and L.P. Ovchinnikov. 1999. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci.* 112 (Pt 20):3487-96.
- Sahlas, D.J., K. Milankov, P.C. Park, and U. De Boni. 1993. Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *J Cell Sci.* 105 (Pt 2):347-57.
- Sanger, J.W., B. Mittal, and J.M. Sanger. 1984. Interaction of fluorescently-labeled contractile proteins with the cytoskeleton in cell models. *J Cell Biol.* 99:918-28.
- Scheer, U., H. Hinssen, W.W. Franke, and B.M. Jockusch. 1984. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell.* 39:111-22.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3685-95.
- Seidensticker, M.J., and J. Behrens. 2000. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1495:168-82.
- Shear, C.R., and R.J. Bloch. 1985. Vinculin in subsarcolemmal densities in chicken skeletal muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J Cell Biol.* 101:240-56.
- Shen, X., R. Ranallo, E. Choi, and C. Wu. 2003. Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol Cell.* 12:147-55.
- Shyu, A.B., and M.F. Wilkinson. 2000. The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell.* 102:135-8.
- Smith, S.S., K.H. Kelly, and B.M. Jockusch. 1979. Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 86:161-6.
- Southby, J., C. Gooding, and C.W. Smith. 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol.* 19:2699-711.

- Spudich, J.A., and S. Watt. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem.* 246:4866-71.
- Squire, J.M. 1997. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol.* 7:247-57.
- Steimle, P.A., J.D. Hoffert., N.B. Adey , and S.W. Craig. (1999) Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filament. *J Bio. Chem.*,274:18414-20.
- Steinmetz, M.O., D. Stoffler, A. Hoenger, A. Bremer, and U. Aebi. 1997. Actin: from cell biology to atomic detail. *J Struct Biol.* 119:295-320.
- Stradal, T., W. Kranewitter, S.J. Winder, and M. Gimona. 1998. CH domains revisited. *FEBS Lett.* 431:134-7.
- Studier, F.W. and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.*189:113-30.
- Stuven, T., E. Hartmann, and D. Gorlich. 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *Embo J.* 22:5928-40.
- Takagaki, Y., and J.L. Manley. 2000. Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol.* 20:1515-25.
- Tang, J.X., P.T. Szymanski, P.A. Janmey, and T. Tao. 1997. Electrostatic effects of smooth muscle calponin on actin assembly. *Eur J Biochem.* 247:432-40.
- R. Treisman. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:205-15.
- Tsukamoto, Y., T. Senda, T. Nakano, C. Nakada, T. Hida, N. Ishiguro, G. Kondo, T. Baba, K. Sato, M. Osaki, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2002. Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest.* 82:645-55.
- Turner, C.E., J.R. Glenney, Jr., and K. Burridge. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol.* 111:1059-68.
- Villarejo, M.R. and I. Zabin. 1974. Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J.Bacteriol.* 120:466-74.
- Villaverde A. and M.M. Carrió 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett.* 25: 1385-95.
- N. Visa. 2005. Actin in transcription. *EMBO reports.* 6:218-19.
- Wachsstock, D.H., J.A. Wilkins, and S. Lin. 1987. Specific interaction of vinculin with alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun.* 146::554-60.
- Wagner, E.J., and M.A. Garcia-Blanco. 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol.* 21:3281-8.
- B.Walders-Harbeck, 2001, Modulation der Aktin-Dynamik durch VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein). Dissertation

- Walders-Harbeck, B., S.Y. Khaitlina, H. Hinssen, B.M. Jockusch, and S. Illenberger. 2002. The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.* 529:275-80.
- Walen, K.H. 1965. Spatial Relationships in the Replication of Chromosomal DNA. *Genetics.* 51:915-29.
- Watabe-Uchida, M., N. Uchida, Y. Imamura, A. Nagafuchi, K. Fujimoto, T. Uemura, S. Vermeulen, F. van Roy, E.D. Adamson, and M. Takeichi. 1998. alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol.* 142:847-57.
- Weekes, J., S.T. Barry, and D.R. Critchley. 1996. Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J.* 314 (Pt 3):827-32.
- Weiss, E.E., M. Kroemker, A.H. Rudiger, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol.* 141:755-64.
- Winder, S.J., B.G. Allen, E.D. Fraser, H.M. Kang, G.J. Kargacin, and M.P. Walsh. 1993. Calponin phosphorylation in vitro and in intact muscle. *Biochem J.* 296 (Pt 3):827-36.
- Winder, S.J., and M.P. Walsh. 1990. Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 265:10148-55.
- Winkler, J., H. Lunsdorf, and B.M. Jockusch. 1996. The ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. *J Struct Biol.* 116:270-7.
- Witt, S. Zieseniss, A., Fock, U., Jockusch, B.M., Illenberger, S. 2004. Comparative biochemical analysis suggests that vinculin and metavinculin cooperate in muscular adhesion sites. *J Biol Chem.* 279: 31533-43.
- Wood, C.K., C.E. Turner, P. Jackson, and D.R. Critchley. 1994. Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci.* 107 (Pt 2):709-17.
- Xie, H., and T.L. Rothstein. 1995. Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol.* 154:1717-23.
- Xie, J., J.A. Lee, T.L. Kress, K.L. Mowry, and D.L. Black. 2003. Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:8776-81.
- Yaffe, D., and O. Saxel. 1977. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 7:159-66.
- Yang, C.C., O.I. Ornatsky, J.C. McDermott, T.F. Cruz and C.A. Prody. 1998. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acid Res.* 26: 4771-4777.
- Yin, H.L., and P.A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol.* 65:761-89.
- Yu, F.X., Johnston, P.A., Sudhof, T.C. and H. L. Yin. 1990. gCAP 39, a calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein. *Science.* 250: 1413-15.

Zemlijic-Harpf A.E., S. Ponrartana, R.T. Avalos, M.C. Jordan, K.P. Roos, N.D. Dalton, V.Q. Phan, E.D. Adamson and R.S. Ross. 2004. Heterozygous inactivation of the vinculin gene predisposes to stress-induced cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 165: 10033-44.

Zhurinsky, J., M. Shtutman, and A. Ben-Ze'ev. 2000. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol.* 20:4238-52.

Ziegler, W.H., U. Tigges, A. Zieseniss, and B.M. Jockusch. 2002. A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem.* 277:7396-404.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zelladhäsionsproteine und ihre Rolle in der Signaltransduktion).....	3
Abbildung 2:	Primärstruktur und schematische Darstellung von Raver1	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Ligandenbindungsstellen von Raver1	10
Abbildung 4:	Schematische Darstellung von PTB	12
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des entfalteten Vinculin-Moleküls und einiger Ligandenbindungsstellen	13
Abbildung 6:	Schematische Darstellung von α -Actinin (nach Fray et al., 2003)	15
Abbildung 7:	Hypothetisches Modell zur Raver1-Funktion (modifiziert nach Jockusch et al., 2003)	17
Abbildung 8:	Gelelektrophoretische Auftrennung aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten oder bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine	39
Abbildung 9:	Expression eines pET28a-Raver1-Konstrukts in den <i>E.coli</i> -Stämmen BL21 und BL21- codon-plus	53
Abbildung 10:	Aufreinigung von rekombinantem Raver1-Protein aus Insektenzellen mittels Ni-NTA- Agarose	55
Abbildung 11:	Gelelektrophoretische Auftrennung und schematische Darstellung aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Raver1-Proteine	56
Abbildung 12:	Untersuchung der Interaktion von Raver1 mit den Schwanzdomänen von Vinculin und Metavinculin	58
Abbildung 13:	Rekombinantes Raver1-Protein bindet im ELISA an die (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne	59
Abbildung 14:	Rekombinantes Raver1 Δ C-Protein bindet im „chemical crosslink“ an die Metavinculin- Schwanzdomäne	60
Abbildung 15:	Bindung von rekombinantem Raver1 Δ C an die (Meta)Vinculin-Schwanzdomäne	61
Abbildung 16:	Raver1 bindet an α -Actinin im „crosslink“-Experiment	62
Abbildung 17:	Raver1 bindet im Spot-Overlay an α -Actinin	63
Abbildung 18:	Raver1 Δ N bindet im „chemical crosslink“ und ELISA an α -Actinin	64
Abbildung 19:	Rekombinantes Raver1 Protein bindet an PTB	65
Abbildung 20:	Raver1 interagiert mit F-, G-, und LD-Aktin	68
Abbildung 21:	Raver1 Δ N bindet an F-Aktin und ECP-Aktin	69
Abbildung 22:	Interaktion von [35 S]-markierten Raver1-Konstrukten mit Aktin im "Dot-Overlay"-Assay	70
Abbildung 23:	Raver1 bindet an F-Aktin und führt zu Ausbildung von Aktinsuprastrukturen	72
Abbildung 24:	Raver1 Δ N bindet an F-Aktin	73
Abbildung 25:	Raver1-Aktin-Interaktion bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen	74
Abbildung 26:	Raver1, Aktin und PTB liegen in C2C12-Zellen in einem Komplex vor	76
Abbildung 27:	Ko-Immunpräzipitation von Raver1 und Aktin nach Gelfiltration	77
Abbildung 28:	Ko-Immunpräzipitation von Raver und Aktin aus HeLaX1/5-Zellen	78
Abbildung 29:	DNase I-Pulldown aus C2C12-Zellextrakten	79
Abbildung 30:	Phosphoinositide binden an Raver1	80

Abbildung 31:	PIP ₂ -ELISA mit rekombinantem Raver1-Protein.....	81
Abbildung 32:	Die rekombinanten Deletionsfragmente Raver1ΔN und Raver1ΔC binden im ELISA an PIP ₂	82
Abbildung 33:	Die Raver1-Aktin-Interaktion wird durch PIP ₂ moduliert.....	83
Abbildung 34:	Raver1 bindet in Overlay-Experimenten an PKCα und wird <i>in vitro</i> von PKCα und PKA phosphoryliert.....	85
Abbildung 35:	Die Hauptphosphorylierungsstelle der PKA befindet sich im Raver1-C-Terminus	86
Abbildung 36:	Spezifitätsnachweis der Raver1-Antikörper im Western-Blot.....	88
Abbildung 37:	Spezifitätsnachweis der Raver1-Antikörper in C2C12-Myoblasten.....	89
Abbildung 38:	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Raver1-Lokalisation im Skelettmuskel: Raver1- Antikörper färben eine feine sarkomere Doppelbande	91
Abbildung 39:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der ..Raver1-Lokalisation in den I-Banden isolierter Skelettmuskelmyofibrillen.....	93
Abbildung 40:	Immuno-Elektronenmikroskopie mit einem Raver1-spezifischen Antikörper	94
Abbildung 41:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Raver1-Lokalisation im Herzmuskel	96
Abbildung 42:	Raver1-Lokalisation auf Blasengewebe	98
Abbildung 43:	Schematische Darstellung hypothetischer Raver1-Funktionen und möglicher Raver1-Aktin- Komplexe.....	111

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung aller verwendeten Sequenzierungsoligonukleotide.....	20
Tabelle 2:	Zusammenfassung aller verwendeten Erstantikörper	22
Tabelle 3:	Zusammenfassung aller eingesetzten Zweitantikörper und anderer verwendeter Agenzien .	23
Tabelle 4:	Zusammenfassung aller relevanten Daten für die am häufigsten Eingesetzten bakteriell exprimierten rekombinanten Proteine.....	38
Tabelle 5:	Zusammenfassung der durchgeführten Expressionsanalysen in <i>E. coli</i>	54
Tabelle 6:	Liste der in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Raver1-Proteine.....	56
Tabelle 7:	Tabelle potentieller in „Yeast Two-Hybrid“-Analysen identifizierter Raver1-Liganden	66

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Mentorin PD Dr. Susanne Illenberger danke ich sehr für ihre Unterstützung und den Rückhalt während der gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe sowie natürlich für die Bereitstellung des interessanten Raver1-Themas. Wenn Raver mal wieder nicht so wollte wie ich, hat sie mir mit steter Diskussions- und Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden. Besonders auch in der Endphase dieser Arbeit war diese Unterstützung von unschätzbarem Wert. Vielen, vielen Dank!!!

Bei Prof. Dr. Hans Henning Arnold möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch danke ich für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe meine Dissertation zu erarbeiten, die fachlichen Anregungen und persönlichen Ratschläge.

Ein großes Dankeschön gebührt ebenso Dr. Joop van den Heuvel und seinem Team, die die Raver1-Expression durchgeführt haben.

Bei Dr. Cora-Ann Schönenberger und Ulrich Schröder bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Analysen der Raver1-Lokalisation.

Elisabeth Ehler danke ich für ihr Interesse am Raver1-Projekt und die Durchführung von Lokalisationsstudien in Cardiomyocyten.

Bei Tania Messerschmidt möchte ich mich nicht nur für die fachlichen Tipps und Hilfestellungen bedanken, sondern auch für die vielen aufmunternden Worte (und Joghurts). Es macht Spaß, mit dir in einem Labor zu arbeiten.

Sabine Buchmeier danke ich für die Herstellung Raver1-spezifischer Antikörper und die Hilfe bei deren Charakterisierung sowie die Einführung in die Gefrierschnitttechnik.

Bei Dr. Björg Pauling möchte ich mich für die geduldige Hilfe mit der FPLC bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Ulrich Tigges, der mir in der gemeinsamen Laborzeit ein Freund geworden ist und sich beim Squash-Spielen als harter Gegner herausgestellt hat.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das tolle Arbeitsklima, Hilfestellungen bei vielen Laborproblemen und die gute Zusammenarbeit bedanken. Viele Kleinigkeiten (und viele Süßigkeiten) haben den Laboralltag verschönert.

Lieber Sebastian, vielen, vielen Dank für deine steten Aufmunterungsversuche und deinen liebevollen Zuspruch. Auch wenn du im letzten Jahr so weit weg warst, war mir deine Unterstützung enorm wichtig.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich nicht nur für die jahrelange finanzielle Unterstützung sondern vor allem für den bedingungslosen, liebevollen Rückhalt und das Ertragen meiner schlechten Laborlaune an vielen Wochenenden, die u.a. mit zahllosen Restaurantbesuchen aufge bessert wurde.